

Vom Genotyp zum Phänotyp -
Phaeobacter inhibens DSM 17395 unter
Berücksichtigung der
extrachromosomalen Elemente:

Phänotypisches MicroArray und Auswertungsmethoden

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Nora Roesky
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Dietmar Schomburg

2. Referent: PD. Dr. Markus Göker

eingereicht am: 04.12.2017

mündliche Prüfung (Disputation) am: 12.02.2018

Druckjahr 2018

Vorveröffentlichungen der Disseration

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

PUBLIKATIONEN

[BPG⁺13] **Buddruhs, Nora**; Pradella, Silke; Göker, Markus; Päu- ker, Orsola; Pukall, Rüdiger; Spröer, Cathrin; Schumann, Peter; Petersen, Jörn; Brinkhoff, Thorsten: **Molecular and phenotypic analyses reveal the non-identity of the *Phaeobacter gallaeciensis* type strain deposits CIP 105210^T and DSM 17395**. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 63(11) (2013), 4340-9

[BCP⁺13] **Buddruhs, Nora**; Chertkov, Olga; Petersen, Jörn; Fiebig, Anne; Chen, Amy; Pati, Amrita; Ivanova, Natalia; Lapidus, Alla; Goodwin, Lynne A.; Chain, Patrick; Detter, John C.; Gronow, Sabine; Kyrpides, Nikos C.; Woyke, Tanja; Göker, Markus; Brinkhoff, Thorsten; Klenk, Hans-Peter: **Complete genome sequence of the marine methyl-halide oxidizing *Leisingera methylohalidivorans* type strain (DSM 14336^T), a representative of the *Roseobacter* clade**. In: *Standards in Genomic Sciences* 9(1) (2013), 128-141

[VSH⁺13] Vaas, Lea A. I.; Sikorski, Johannes; Hofner, Benjamin; Fiebig, Anne; **Buddruhs, Nora**; Klenk, Hans-Peter; Göker, Markus: **opm: An R Package Analysing OmniLog (R) Phenotype MicroArray Data** In: *Bioinformatics* 29(14) (2013), 1823-1824

[XSB⁺11] Xue, Xiaoli; Sztajer, Helena; **Buddruhs, Nora**; Petersen, Jörn; Rohde, Manfred; Talay, Susanne R.; Wagner-Döbler, Irene: **Lack of the delta subunit of RNA polymerase increases virulence related traits of *Streptococcus mutans***. In: *PloS one* 6(5) (2011), e20075

TAGUNGSBEITRÄGE

09/2012 – **Buddruhs, Nora**. Vortrag: ***Phaeobacter gallaeciensis* DSM 17395 and oceans plastic waste** *Youmares 0.3*, Bremerhaven, Deutschland, 2012.

07/2011 – **Buddruhs, Nora**; Frank, Oliver; Pradella, Silke; Petersen, Jörn. Poster: **Phenotypical MicroArray of the wild type *Phaeobacter gallaeciensis* and its plasmid knock-out mutants** *Microbial Interactions in Marine Systems (MIMAS)*, Karlsruhe, Deutschland, 2011.

04/2011 – **Buddruhs, Nora**; Frank, Oliver; Michael, Victoria; Päu- ker, Or-

sola; Pradella, Silke; Petersen, Jörn. Poster: **Comparative phenomics of the wild type *Phaeobacter gallaeciensis* and its 65 kb plasmid knock-out mutant** *Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Karlsruhe, Deutschland, 2011.

All's Well That Ends Well

William Shakespeare

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Prof. Schomburg, PD Dr. Markus Göker und PD Dr. Barbara Schulz sowie Dr. Bührig aussprechen.

Des Weiteren danke ich für die Finanzierung im Rahmen des Projekts *Roseobacter* im DFG Sonderforschungsbereich.

Ich danke meiner Familie: meinem Mann, meinen Kindern, meinen Geschwistern, meinen Eltern mit Partnern, meinen Großeltern, meinem Onkel und meinen Schwiegereltern.

Abstract

The marine bacterium *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, formerly *Phaeobacter gallaeciensis*, belongs to the *Roseobacter* clade and was analysed regarding its genotype – consisting of the chromosome and three extrachromosomal elements – and phenotype. The extrachromosomal elements are classified as chromids, formerly plasmids.

First, the extrachromosomal elements of different species within the *Roseobacter* clade were genotypically studied regarding their significance for the formation of biofilms and phenotypically tested via biofilmassays. Second, the phenotypical MicroArray technique (PM, Biolog Inc.) was applied for evaluating *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 and its three chromid mutants: (1) without the 262 kb chromid, (2) without the 65 kb chromid as well as (3) the double mutant without the 262 kb and the 65 kb chromid. Third, the evaluation of the PM was conducted by means of a discriminant analysis through the selection of chromid mutants. Thus it was possible to draw conclusions regarding the importance of the chromids for biofilm formation, the metabolism and the tolerance against different chemicals. The phenotypical MicroArray technique is a method that works indirectly.

One finding was the noticeable geno- and phenotypical relevance of the biggest and especially the smallest chromid for biofilm formation as a prominent characteristic of *P. inhibens* DSM 17395, even within the *Roseobacter* clade. Further findings regarding the primary and secondary metabolism of *P. inhibens* DSM 17395 were made using the PM technique. This includes metabolism pathways like the Entner Doudoroff pathway or the citric acid cycle, as well as new findings regarding the fermentation and degradation processes.

The chemicals tolerated due to the genetic information of the chromids of *P. inhibens* DSM 17395 yielded a broad spectrum of 164 different substances belonging to the classes of **biocides**, **metabolites**, **secondary metabolites**, **amino acids** in conjunction with the **pH-value scope**, **aromates**, **inorganic substrates**, **halogenated substrates**, **psychotropic drugs**, **antiseptic agents** and **cytostatic drugs** of the subclasses **alkylating agents**, **antimetabolites** and **antibiotics**. Among the considered chemical substrates there are highly toxic ones like *Hexachlorophene*, whose degradation product (2,3,7,8-substituted *tetrachlorinated Dibenzo-p-dioxine*) is classified as the

most toxic synthesized substance to date. Numerous chromid-coding **multi-drug- and pheromone transporter**, chromi localized **regulators** as well as **multiple antibiotic resistant regulators** are encoded in the genome of *P. inhibens* DSM 17395. These genome sequences may be responsible for the tolerance of the marine bacterium towards the numerous chemical substances listed above. In addition, the presence of the big 262 kb chromid in combination with the small 65 kb chromid seems to have an important role. In certain cases, non-standard reactions took place, where the bacterium without the specific chromid reacted more intensively or rather was more resistant. This reaction could have been triggered by the specific substance, respectively living condition, which stimulates the bacterium to use metabolism pathways irrelevant under normal conditions.

Studies regarding nearly all tested chemical as well as pharmaceutical substances have been conducted and verify the presence of the often toxic substrates in different parts of the ocean. Therefore a drug tolerance seems to be important for the survival of the marine bacterium.

Roseobacter, drugs, phenotype MicroArray, marine biology, metabolism

Zusammenfassung

Das Meeresbakterium *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, ehemals *Phaeobacter gallaeciensis*, gehört der *Roseobacter*-Klade an und wurde ausgehend vom Genotyp – einem Chromosom und drei extrachromosomale Elementen – auf seinen Phänotyp hin untersucht. Die extrachromosomalen Elemente, ehemals Plasmide, sind als Chromide klassifiziert.

Die extrachromosomalen Elemente von unterschiedlichen Spezies innerhalb der *Roseobacter*-Klade wurden zunächst bezüglich ihrer Bedeutung für eine Biofilmbildung genotypisch untersucht und phänotypisch mittels Biofilmassays getestet. Für *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 und drei Chromid-Mutanten des Bakteriums: (1) ohne das 262 kb-Chromid, (2) ohne das 65 kb-Chromid sowie (3) der Doppelmutante ohne das 262 kb- und das 65 kb-Chromid, wurde die phänotypischen MicroArray-Technik (PM) der Fa. Biolog angewendet. Diese konnte durch die Wahl der Chromid-Mutanten mit einer Diskriminanzanalyse ausgewertet werden, so dass Rückschlüsse auf die Bedeutung der Chromide für die Biofilmbildung, den Stoffwechsel und die Toleranz gegenüber unterschiedlicher Chemikalien möglich waren. Bei der phänotypische MicroArray-Analyse handelt es sich um ein indirektes Verfahren.

Ein Ergebnis war die auffallende geno- und phänotypische Relevanz des großen und besonders des kleinen Chromids von *P. inhibens* DSM 17395 für die Fähigkeit zur Biofilmbildung. Sogar innerhalb der *Roseobacter*-Klade sticht diese Charakteristik des Bakteriums heraus. Durch die Verwendung des phänotypischen MicroArrays konnten weitere Erkenntnisse über primäre und sekundäre Stoffwechselwege von *P. inhibens* DSM 17395 gewonnen werden. Dazu gehörten Stoffwechselprozesse des Entner-Doudoroff-Wegs oder dem Citrat-Zyklus, sowie neue Erkenntnisse im Rahmen von Gärungs- und Verwesungsprozessen.

Die Untersuchung der Chemikalien, die auf Grund der genetischen Information der Chromide von *P. inhibens* DSM 17395 toleriert wurden, ergab ein breites Spektrum von 164 unterschiedlichen Substanzen. Zu den tolerierten Chemikalien gehören Substanzen der Klassen der **Biozide, Metabolite, Sekundärmetabolite, Aminosäuren** in Verbindung mit dem **pH-Wert Bereich, Aromaten, anorganische Substrate, halogenhaltige Substrate, Psychopharmaka, Antiseptika** und **Zytostatika** der Unterklassen **Alkylazien, Antimetabolite** und **Antibiotika**. Unter den Chemikalien finden sich

auch hoch toxische Substanzen wie *Hexachlorophen* wider, dessen Abbauprodukt (2,3,7,8-substituiert *tetrachloriertes Dibenzo-p-dioxin*) als giftigste bisher synthetisierte Substanz klassifiziert ist. Neben zahlreichen Chromid-kodierten **Multidrogen- und Pheromontransportern**, kodieren auch Chromid-lokalisierte **Regulatoren** sowie **multiple Antibiotikaresistenz-Regulatoren** im Genom von *P. inhibens* DSM 17395. Diese Genomsequenzen könnten maßgeblich für das Toleranzverhalten des Meeresbakteriums gegenüber den zahlreichen Chemikalien verantwortlich sein. Zusätzlich scheint die Präsenz des großen 262 kb-Chromids in Kombination mit dem kleinen 65 kb-Chromid eine wichtige Bedeutung zu haben. Bei einigen Substraten kam es zu Sonderreaktionen, bei denen das Bakterium ohne das jeweilige Chromid stärker reagierte bzw. resistenter war. Dies könnte durch die jeweilige Substanz, beziehungsweise Lebensbedingung, getriggert worden sein, die das Bakterium zu Stoffwechselvorgängen anregt, die unter normalen Umständen keine Bedeutung haben.

Zu fast alle Chemikalien gibt es bereits Studien, die eine Präsenz der häufig toxischen Substrate in unterschiedlichen Teilen der Weltmeere nachweisen, so dass eine Toleranzentwicklung gegenüber der Vielfalt an Chemikalien relevant für das Überleben des Meeresbakteriums erscheint.

Roseobacter, Pharmazeutika, phänotypisches MicroArray, Meeresbiologie, Metabolismus

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis	xv
1 Einleitung	1
1.1 <i>Roseobacter</i> -Klade	1
1.2 Genus <i>Phaeobacter</i>	2
1.2.1 Systematisierung der <i>Phaeobacter</i> Stämme	2
1.2.2 Stamm <i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395 als Modellor- ganismus	5
1.2.3 Die extrachromosomalen Elemente von <i>Phaeobacter in- hibens</i> DSM 17395	7
1.3 Datenanalyse in den Lebenswissenschaften	8
1.4 Phänotypische Analyse	9
1.5 Zielsetzung	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Ausstattung und Instrumente	13
2.2 Verbrauchsmaterial	13
2.3 Chemikalien	13
2.4 Bakterienstämme	13
2.5 Medien und Supplemente	16
2.5.1 Komplexmedium Marine Broth	16
2.5.2 Minimalmedium Salzwasser	16
2.5.3 Phänotypisches MicroArray-Inokulationsmedium	17
2.6 Methoden zum Phänotyp	17

2.6.1	Biofilmassay	19
2.6.2	Phänotypisches MicroArray (PM) der Fa. Biolog	19
2.7	Statistische Datenanalyse der PM-Ausgabedateien	20
2.7.1	R-Paket <i>opm</i> : Entwicklung eines geeigneten Programms zur Auswertung von phänotypischen MicroArray-Daten	20
2.7.2	Datenmanagement mittels <i>opm</i>	21
2.7.3	Methodik – Diskriminanzanalyse	21
2.8	Software	22
2.9	Datenbanken	22
3	Ergebnisse	27
3.1	Die Bedeutung der extrachromosomalen Elemente für die Bio- filmbildung innerhalb der <i>Roseobacter</i> -Klade	27
3.1.1	Genomik	27
3.1.2	Biofilmassay	30
3.2	R-Paket <i>opm</i> zur Analyse von Daten des phänotypischen Mi- croArrays (PM)	33
3.2.1	Kategorisierung der PM-Substrate	34
3.2.2	Auswertungsmethoden	34
3.3	Phänotypisches MicroArray (PM) - Kohlenstoffquellen	35
3.3.1	Klassifizierung des <i>P. inhibens</i> DSM 17395 Wildtyps und der Chromidmutanten	35
3.3.2	Diskriminanzanalyse	35
3.4	Phänotypisches MicroArray (PM) - Chemikaliertoleranz	40
3.4.1	Diskriminanzanalyse	40
3.4.2	Kernenzyme für Chemikaliertoleranzen - Chromid 65 kb und Chromid 262 kb	48
4	Ergebnistabellen zu phänotypischem MicroArray (PM) - Koh- lenstoffquellen	53
5	Ergebnistabellen zu phänotypischem MicroArray (PM) - Che- mikaliertoleranz	65
6	Diskussion	95
6.1	Die Bedeutung der extrachromosomalen Elemente für die Bio- filmbildung innerhalb der <i>Roseobacter</i> -Klade	95

6.1.1	<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395	95
6.1.2	<i>Roseobacter</i> -Klade	96
6.2	<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395 und Chromidmutanten <i>Genotyp/Phänotyp</i> -	
	Kohlenstoffquellen (PM01/PM02)	98
6.2.1	Transport- und Abbaustoffwechselwege –	
	Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg	98
6.2.2	Transport- und Abbaustoffwechselwege –	
	Citratzyklus	103
6.2.3	Transport- und Abbaustoffwechselwege –	
	Gärungs- und Verwesungsprozesse	105
6.2.4	Nukleinsäuren	109
6.3	<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395 und Chromidmutanten <i>Genotyp/Phänotyp</i> -	
	Chemikaliertoleranz (PM10-PM20)	110
6.3.1	PM - Biozide	111
6.3.2	PM - Metabolite	115
6.3.3	PM - Sekundärmetabolite	117
6.3.4	PM - Aminosäuren und pH-Wert Bereich	121
6.3.5	PM - Aromaten	122
6.3.6	PM - anorganische Substrate	124
6.3.7	PM - halogenhaltige Substrate	125
6.3.8	PM - Psychopharmaka	126
6.3.9	PM - Antiseptika	128
6.3.10	PM - Zytostatika	128
6.3.11	PM - Zytostatika - Alkylanzien	129
6.3.12	PM - Zytostatika - Antimetabolite	130
6.3.13	PM - Zytostatika - Antibiotika	132
6.3.14	PM - unklassifizierte Chemikalien	139

7 Fazit

141

Abbildungsverzeichnis

1.1	<i>Midpoint-rooted MP</i> Phylogenie abgeleitet von 16S-rRNA-Gensequenzen der <i>Phaeobacter</i> Stämme, die in einem nahen Verwandtschaftsverhältnis zu <i>P. inhibens</i> und <i>P. gallaeciensis</i> stehen. Die Verzweigungen sind nach DELTRAN Optimierung [SHR08] skaliert. Die Zahlen über den Verzweigungen unterstützen die Werte von <i>MP</i> (links) und <i>ML</i> (rechts) <i>Bootstrapping</i> . Die Originaltermini der Stämme nach den Bezeichnungen der Sammlungen sind in Klammern gestellt; die <i>Accession Numbers</i> stehen in eckigen Klammern.	3
1.2	<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395 Wildtyp (wt); braun pigmentierte Zellen auf einer Agar-Platte (links), rosettenförmige Anordnung durch Elektronenmikroskopie (SEM) dokumentiert (rechts, [FMP ⁺ 15]). Scale bar, 0.5 Mikrometer	6
1.3	Datenvernetzung in mikrobielle <i>-omics Pipelines</i> [FL15]. Die orangenen Kästchen enthalten die mögliche Software, während die blauen Kästchen spezifische Anwendungen der generellen <i>-omics</i> Strategie enthalten.	8
1.4	Struktur und Reduktion von Tetrazolium [BS77]	11
2.1	Ergebnismöglichkeiten der Diskriminanzanalyse	23
3.1	Klassifizierung der extrachromosomalen Elemente von <i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395 zu den drei Chromiden mittels COG-Kategorien; <i>R-Development.Core-Team</i> (2011)	29

3.2	Genomsequenzannotations-Vergleich von biofilm-assoziierten [LJ10] extrachromosomalen Elementen von Spezies der <i>Roseobacter</i> -Klade mittels <i>RAST-Blast</i> [ABB ⁺ 08]; pPinh65: 65 kb großes ECE von <i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395, pLale69: 69 kb großes ECE von <i>Labrenzia alexandrii</i> DSM 17067 ^T , pRden69: 69 kb großes ECE von <i>Roseobacter denitrificans</i> DSM 7001 ^T , pMalg53: 53 kb großes ECE von <i>Marinovum algicola</i> DG898, pDshi86: 86 kb großes ECE von <i>Dinoroseobacter shibae</i> DSM 16493 ^T , pRlit83 und pRlit64: 83 kb und 64 kb große ECE von <i>Roseobacter litoralis</i> DSM 6996 ^T	30
3.3	Boxplot zu den Ergebnissen des Biofilmassays von <i>P. inhibens</i> DSM 17395, <i>Marinovum algicola</i> DG898, <i>Marinovum algicola</i> DSM 10251 ^T , <i>Dinoroseobacter shibae</i> DSM 16493 ^T , <i>Roseobacter litoralis</i> DSM 6996 ^T , <i>Roseobacter denitrificans</i> DSM 7001 ^T in Marine Broth und Salzwassermedium	31
3.4	Boxplot zu den Ergebnissen des Biofilmassays von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 sowie den Chromid-Mutanten	32
3.5	Genereller Arbeitsfluss des <i>opm</i> Pakets sowie der Einbindung in <i>R</i> und den Schnittstellen zu Software von Dritten [VSH ⁺ 13] . . .	33
3.6	<i>opm-Heatmap</i> zur Klassifizierung von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 und den drei Chromid-Mutanten über die Substrate von PM01 und PM02 als dreifache Replikate; <i>none</i> bezeichnet dabei die Negativkontrolle ohne Bakterien.	36
3.7	Kreisdiagramme mit absoluten positiven Reaktionen zur Einordnung der Substratklassen der Mono-, Di- und Polysaccharide, Alkohole, Amino- und Carbonsäuren, Amine und Nukleinsäuren, die durch die genetische Information der verschiedenen Kompartimente von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 entstehen; links oben pPinh262kb, rechts oben pPinh65kb, links unten pPinh262kb-pPinh65kb, rechts unten Pinh-c-pPinh78kb.	37

3.8	Kreisdiagramme mit absoluten positiven Reaktionen zur Einordnung der Klassen der Biozide, Metaboliten, Sekundärmetaboliten, Aminosäuren, Aromaten, anorganischen Substrate, halogenhaltigen Substrate, Psychopharmaka, Antiseptika, Zytostatika – Alkylanzien, Zytostatika – Antimetabolite, Zytostatika – Antibiotika und unklassifizierten Chemikalien, die durch die genetische Information der verschiedenen Kompartimente von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 toleriert werden; links oben pPinh262kb, rechts oben pPinh65kb, links unten pPinh262kb_pPinh65kb, rechts unten Pinh_c_pPinh78kb.	46
3.9	Kreisdiagramme mit absoluten positiven Reaktionen zur Einordnung der Zytostatika – Antibiotikatoleranzen der Klassen B-Lactame – Cephalosporine, B-Lactam – Monobactame, B-Lactame – Penicilline, Fosfomycine, Glykopeptide, Polypeptide, Sulfonamide, Thionamide, Chinolone, Nitrofurane, Nitroimidazole, Aminoglykoside, Tetrazykline und Lincosamide, die durch die genetische Information der verschiedenen Kompartimente von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 toleriert werden; links oben pPinh262kb, rechts oben pPinh65kb, links unten pPinh262kb_pPinh65kb, rechts unten Pinh_c_pPinh78kb.	47
6.1	(A) Rekonstruktion der Transport- und Abbaustoffwechselwege für fünf ausgewählte Kohlenhydrate in <i>P. inhibens</i> DSM 17395. Zusätzliche Informationen der fünf ausgewählten Kohlenhydrate in (B), aus [WHW ⁺ 14]	100
6.2	Rekonstruktion der Abbauewege für neun ausgewählte Aminosäuren in <i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395 [DHT ⁺ 14].	104
6.3	Buttersäurestoffwechselweg mit dem rot gekennzeichnetem Enzym <i>Bernsteinsäure-Semialdehyd Dehydrogenase GabD</i> (PGA1_262p00540), das auf dem 262 kb großen extrachromosomalen Element kodiert und möglicherweise genregulatorische Eigenschaften besitzt. [KGS ⁺ 14]	106
6.4	Abbau von <i>Putrescin</i> mittels Enzym <i>Bernsteinsäure-Semialdehyd Dehydrogenase GabD</i> (PGA1_262p00540), das auf dem 262 kb großen extrachromosomalen Element kodiert und offensichtlich genregulatorische Eigenschaften besitzt. [TKV ⁺ 12]	108

Tabellenverzeichnis

2.1	Ausstattung und Instrumente	14
2.2	Verbrauchsmaterial	15
2.3	Bakterienstämme; das hochgestellte ^T definiert den jeweiligen Stamm als Typstamm	15
2.4	<i>Basic A</i> Stocklösung (Salzlösung) (10x)	16
2.5	<i>Basic B</i> Stocklösung (Puffer) (100x)	16
2.6	<i>Stocklösung Vitamine</i> (100x)	17
2.7	<i>Stocklösung Spurenelemente</i> (1000x)	17
2.8	<i>Biolog Inokulationsmedium 1, PM01 und PM02</i>	18
2.9	<i>Biolog Inokulationsmedium 2, PM10-PM20</i>	18
2.10	Software in dieser Studie	24
2.11	Datenbanken in dieser Studie	25
3.1	COG-Kategorien	28
3.2	Antibiotikaklassen, die im phänotypischen MicroArray verwendet werden; (WM = Wirkungsmechanismus).	41
3.3	Fortsetzung. Antibiotikaklassen, die im phänotypischen MicroArray verwendet werden; (WM = Wirkungsmechanismus).	42
3.4	Fortsetzung I. Antibiotikaklassen, die im phänotypischen MicroArray verwendet werden; (WM = Wirkungsmechanismus).	43
3.5	Fortsetzung II. Antibiotikaklassen, die im phänotypischen MicroArray verwendet werden; (WM = Wirkungsmechanismus).	44
3.6	Antibiotikaklassen des phänotypischen MicroArrays der Superklasse <i>B-Lactame</i> mit der Klasse des Wirkungsmechanismus <i>Hemmung der Zellwandsynthese</i> und der Beschreibung des Wirkungsmechanismus <i>Unterbrechung der Synthese der Peptidoglykanschicht der bakteriellen Zellwand</i>	45

4.1	Das 262 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Mono-, Di- und Polysaccharide, sowie Alkohole durch zugehörige Kernenzyme	54
4.2	Das 262 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Aminosäuren oder ihre Derivate, sowie Carbonsäuren und Amine durch zugehörige Kernenzyme	55
4.3	Das 65 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Carbonsäure	56
4.4	Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Mono-, Di- und Polysaccharide, sowie Alkohole durch zugehörige Kernenzyme	57
4.5	Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Aminosäuren oder Derivate durch zugehörige Kernenzyme	58
4.6	Fortsetzung I. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Aminosäuren oder Derivate durch zugehörige Kernenzyme	59
4.7	Fortsetzung II. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Aminosäuren oder Derivate durch zugehörige Kernenzyme	60
4.8	Fortsetzung III. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Aminosäuren oder Derivate durch zugehörige Kernenzyme	61
4.9	Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Carbonsäuren durch zugehörige Kernenzyme	62

4.10	Fortsetzung I. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Carbonsäuren durch zugehörige Kernenzyme	63
4.11	Das Chromosom und/oder das 78 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Amino-, Carbonsäuren, sowie Nukleinsäuren durch zugehörige Kernenzyme	63
4.12	Sonderreaktionen von <i>P. inhibens</i> DSM 17395	63
5.1	Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber anorganischen Stoffen von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 Chromid 262 kb; COG-Kategorien K, P, Q, R.	66
5.2	Fortsetzung. Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber anorganischen Stoffen von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 Chromid 262 kb; COG-Kategorien E und P.	67
5.3	Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber, z.B. multiplen Antibiotika, organischen Lösungsmitteln, Haushaltsdesinfektionsmitteln, oxidative Stressagentien oder Pathogenfaktoren von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 Chromid 262 kb bzw. 65 kb; COG-Kategorien E, Q, R, V.	68
5.4	Fortsetzung. Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber, z.B. multiplen Antibiotika, organischen Lösungsmitteln, Haushaltsdesinfektionsmitteln, oxidative Stressagentien oder Pathogenfaktoren von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 Chromid 262 kb bzw. 65 kb; COG-Kategorien E, Q, V.	69
5.5	Fortsetzung I. Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber, z.B. multiplen Antibiotika, organischen Lösungsmitteln, Haushaltsdesinfektionsmitteln, oxidative Stressagentien oder Pathogenfaktoren von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 Chromid 262 kb bzw. 65 kb; COG-Kategorien K und M.	70
5.6	Fortsetzung II. Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber, z.B. multiplen Antibiotika, organischen Lösungsmitteln, Haushaltsdesinfektionsmitteln, oxidative Stressagentien oder Pathogenfaktoren von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 Chromid 262 kb bzw. 65 kb; COG-Kat. K und M.	71

5.7	Das 262 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Aromaten und Sekundärmetaboliten	72
5.8	Das 262 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Anorganische Stoffe und Halogene (x = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl)	73
5.9	Das 262 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Zytostatika – Antimetabolite	74
5.10	Das 262 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Zytostatika – Antibiotika	75
5.11	Fortsetzung. Das 262 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Zytostatika – Antibiotika	76
5.12	Das 262 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Psychopharmaka, Antiseptika und Biozide	77
5.13	Das 262 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen von unkategorisierten Substraten	78
5.14	Das 65 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Sekundärmetabolite und Halogene (x = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl)	78
5.15	Das 65 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Zytostatika – Antibiotika, Antimetaboliten und weiteren Chemikalien	79
5.16	Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Aminosäuren, Aromaten, Sekundärmetabolite	80
5.17	Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Anorganischen Stoffe	81

5.18	Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Halogene (x = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl)	82
5.19	Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Psychopharmaka, der Antiseptika, der Zytostatika – Antimetabolite, sowie – Antibiotika	83
5.20	Fortsetzung. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antibiotika	84
5.21	Fortsetzung I. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antibiotika	85
5.22	Fortsetzung II. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antibiotika	86
5.23	Fortsetzung III. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antibiotika und Biozide	87
5.24	Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten unkategorisierten Substrate	88
5.25	Fortsetzung. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 k -großen Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten unkategorisierten Substrate	88
5.26	Das Chromosom und/oder das 78 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Aminosäuren, Aromaten und Sekundärmetaboliten	88

5.27	Das Chromosom und/oder das 78 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Anorganischen Stoffe und Halogene (x = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl)	89
5.28	Das Chromosom und/oder das 78 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antimetabolite, sowie Antibiotika . .	90
5.29	Das Chromosom und/oder das 78 kb große Chromid von <i>P. inhibens</i> DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antibiotika, Biozide und unkategorisierten Substrate	91
5.30	Sonderreaktionen von <i>P. inhibens</i> DSM 17395	92
5.31	Sonderreaktionen von <i>P. inhibens</i> DSM 17395	93
5.32	Sonderreaktionen von <i>P. inhibens</i> DSM 17395	94

Abkürzungsverzeichnis

A	max. Höhe
AHL	Acyl-Homoserine Lactone
AP	antimikrobielle Peptide
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under The Curve
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
COG	Cluster of Orthologous Groups
CRAN	The Comprehensive R Archive Network
CIP	Collection Institute Pasteur
COG	Gruppen orthologer Gene
DDH	DNA-DNA Hybridisierung
DMSP	Dimethylsulfonylpropionat
DOI	Digital Object Identifier
DSMZ	Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECE	extrachromosomale Elemente
EPS	Exopolysaccharid
GAM	generalized additive models
HGT	horizontaler Gentransfer

ID	Identifikator
MALDI-TOF	Matrix Assistierte Laser Desorption Ionisierung (MALDI) kombiniert mit Flugzeitanalyse (engl. time of flight, TOF)
NADH	reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid
OD	optische Dichte
PBP	penicillinbindende Proteine
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PM	Phänotypische MicroArray
pPinh65	kleinstes extrachromosomales Element von P. inhibens DSM 17395
pPinh262	größtes extrachromosomales Element von P. inhibens DSM 17395
pPinh65_262	kleinstes und größtes extrachromosomales Element von P. inhibens DSM 17395
Pinh_c_pPinh78kb	Chromosom und 78 kb großes extrachromosomales Element von P. inhibens DSM 17395
QS	Quorum sensing; chemische Kommunikation
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Scanning Electron Microscopy
T	Transmission
TCA	Citratzyklus
TCDD	tetrachlorierte Dibenzo-p-dioxine
TDA	Antibiotic Trophic Acid
WM	Wirkungsmechanismus

Kapitel 1

Einleitung

Bakterien haben eine durchschnittliche Größe von 0,2 bis 0,6 Mikrometer [PWAH07]. Die Weltmeere beinhalten überschlägig 10^{29} Bakterien. Zum Vergleich gibt es 10^{21} Sterne im Universum [WCW98]. Bakterien kommt somit eine bedeutende Rolle im globalen Ökosystem der Meere zu. Sie dominieren die Abundanz, Diversität und metabolische Aktivität der Meere [ABB⁺08].

1.1 *Roseobacter*-Klade

Bakterien können in Kladen unterteilt werden [RG03]. Der Begriff *Klade* impliziert ein Set von verwandten Organismen [GBMF99]. Die *Roseobacter*-Klade wird klassifiziert als *Alphaproteobakterium* zugehörig der Ordnung *Rhodobacterales* der Familie *Rhodobacteraceae*. Bakterienspezies dieser Klade kommen sowohl in gemäßigten als auch in polaren Zonen der Meere vor [SSB04]. Sie repräsentieren bis zu 20% der Artengemeinschaften im Küstenbereich und 15% der bakterioplanktonischen Artengemeinschaften im Ozean [BGM05]. Gerade Küstenregionen, Meeresarme, *shelf areas* (z.B. die Nordsee) und *up-welling* Zonen (z.B. *off coast* Namibia), sind marine Systeme mit hohem Nährstoffgehalt. Die konstante Nährstoffzufuhr in diesen Zonen sind die Basis für Meeres- und phytoplanktonische Blüten, welche nach ihrem Kollaps massive Mengen organischen Materials frei lassen. Das beinhaltet neben großen Mengen an Proteinen und Peptiden auch freie Aminosäuren. Heterotrophe marine Bakterien, wie die Arten der *Roseobacter*-Klade, spielen eine große Rolle in der Mineralisierung des freien organischen Materials und somit im globalen Kohlenstoffzyklus [ZHK⁺13]. Das metabolische Spektrum dieser Linie ist jedoch noch

weiter gefasst, da sie frei schwimmend, im Sediment, angeheftet an Partikel oder assoziiert mit marinen Eukaryoten, in mannigfaltigen marinen Habitaten auftreten [TWH⁺16] [BBL⁺12] [BGS08b] [SB09] [WDB06] [BCP⁺13].

1.2 Genus *Phaeobacter*

Der marine Genus *Phaeobacter* beinhaltet die Spezies *Phaeobacter inhibens*, *P. gallaeciensis*, *P. daeponiensis*, *P. caeruleus*, *P. arcticus* und *P. leonis* [GTC⁺13], die zu der Roseobacter-Klade gehören. Diese Etablierung erfolgte durch Martens *et al.* [MHP⁺06] nach der Reklassifizierung von *Roseobacter gallaeciensis* [RPCLN98] als *P. gallaeciensis*, der der Typstamm des Genus ist, und der Beschreibung von *Phaeobacter inhibens* als neue Spezies. In den letzten Jahren erlangten unterschiedliche *Phaeobacter* Stämme erhöhte Aufmerksamkeit durch ihre Fähigkeit diverse Sekundärmetabolite zu synthetisieren [BNS⁺11] [BBL⁺12] [BBH⁺04] [BGB07] [MGG⁺07] [GBN⁺08] [MGG⁺07] [SCKC11b] [SCKC11a]. Da *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, ehemals *Phaeobacter gallaeciensis* DSM 17395, auch der Modellorganismus dieser Studie ist, nahmen wir dies zum Anlass, die Systematisierung der *Phaeobacter* Stämme hinsichtlich ihrer Identitäten und Zugehörigkeiten als Grundlage für weitere Modifizierungen, Experimente und Analysen zu untersuchen.

1.2.1 Systematisierung der *Phaeobacter* Stämme

Der Typstamm der Typart, *Phaeobacter gallaeciensis* BS107^T, wurde in unterschiedlichen Sammlungen für Mikroorganismen weltweit hinterlegt. Durch verschiedenartige Pigmentierung *in vitro* und unterschiedliche Plasmidprofile in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) entdeckten wir, dass die hinterlegten *P. gallaeciensis* Typstämme an dem Collection Institute Pasteur (CIP; Paris, Frankreich) als CIP 105210 und der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig, Deutschland) als DSM 17395 nicht, wie vorher angenommen, identisch waren [BPG⁺13]. Um die Identität der beiden Stämme zu ermitteln, wandten wir zusätzliche Methoden an: Die PFGE der extrachromosomalen Elemente wurde durch die Genomsequenzen der *Phaeobacter*-Stämme DSM 17395, DSM 24588 [TKV⁺12], DSM 16374^T [DVT⁺13] und CIP 105210 [FPR⁺14] unterstützt. Die DNA-DNA-Hybridisierung (DDH), 16S-rRNA-Gensequenzanalysen, 16S-23S-rRNA-Gen-

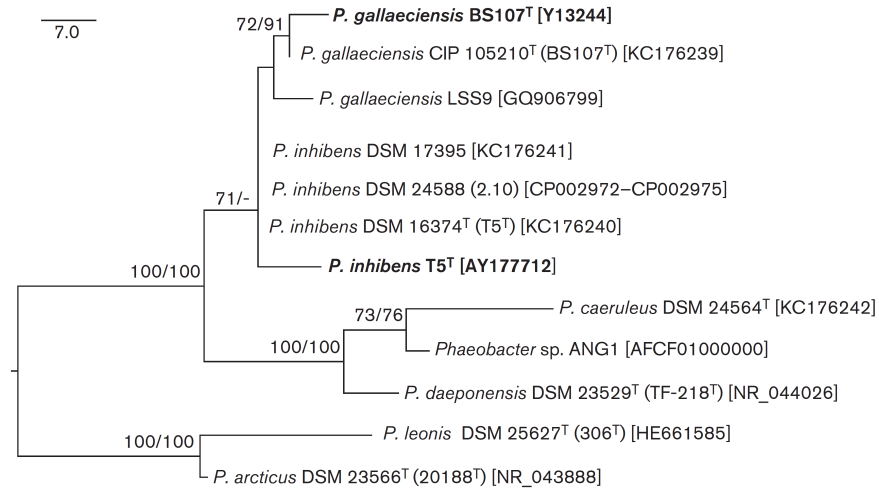


Abbildung 1.1: *Midpoint-rooted MP* Phylogenie abgeleitet von 16S-rRNA-Gensequenzen der *Phaeobacter* Stämme, die in einem nahen Verwandtschaftsverhältnis zu *P. inhibens* und *P. gallaeciensis* stehen. Die Verzweigungen sind nach DELTRAN Optimierung) [SHR08] skaliert. Die Zahlen über den Verzweigungen unterstützen die Werte von *MP* (links) und *ML* (rechts) *Bootstrapping*. Die Originaltermini der Stämme nach den Bezeichnungen der Sammlungen sind in Klammern gestellt; die *Accession Numbers* stehen in eckigen Klammern.

ITS-Sequenzanalysen, die MALDI-TOF-MS-Protein-Analyse und die Hochdurchsatzanalyse mittels der phänotypischen MicroArray-Technologie unterstützen die Befunde, dass die *Phaeobacter* Stämme CIP 105210 und DSM 17395, beide hinterlegt als Typstamm *P. gallaeciensis* BS107^T, biologisch nicht identisch waren. Die ITS-Sequenzanalyse und die MALDI-TOF-Analyse zeigten zusätzlich, dass DSM 17395 (und DSM 24588) zusammen mit *P. inhibens* DSM 16374^T gruppieren (unter Ausschluss von CIP 105210), Abbildung 1.1.

Wie von der DDH (mit mehr als 76% Ähnlichkeit) bestätigt, sind DSM 16374^T, DSM 17395 und DSM 24588 Artgenossen und gehören alle der Spezies *P. inhibens* an. Die Analyse der 16S-rRNA-Gensequenzen dieser Stämme waren ebenfalls in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen, weil die Sequenzen der Stämme identisch waren (wenn der resequenzierte 16S-rRNA-Gensequenz des DSM 16374^T bedacht war). Unsere Sequenzanalyse bestätigt die Ergebnisse von Thole *et al.* [TKV⁺12], dass *Phaeobacter* sp. ANG1 nicht zu der Spezies *P. gallaeciensis* gehört. Da DSM 17395 folglich aus der Spezies *P. gallaeciensis* ausgeschlossen werden musste, stellte sich die Frage, ob die Hinterlegung des

alternativen Typstamms, CIP 105210, Stamm *P. gallaeciensis* BS107^T repräsentiert. Die DDH-Analyse (mit weniger als 70% Ähnlichkeit) deutet darauf hin, dass CIP 105210 kein Artgenosse zu *P. inhibens* ist. Analysen zum Wachstumsverhalten und enzymatischen Aktivitäten konnten die Ergebnisse von Ruiz-Ponte *et al.* [RPCLN98] nicht vollständig reproduzieren. Bei der geringen Anzahl der getesteten Merkmale mit der geringen Anzahl der Unterschiede zu dem Typstamm der Schwesterspezies, *P. inhibens*, und den allgemein bekannten Schwierigkeiten der Reproduzierbarkeit von physiologischen Tests in unterschiedlichen Laboratorien, ist die Signifikanz der Diskrepanzen jedoch unklar. Basierend auf den neu generierten CIP 105210 16S-rRNA-Gensequenzen, die identisch sind zu BS107^T, abgesehen von Abweichungen, die höchstwahrscheinlich Sequenzfehler waren, ist entscheidend, dass wir klar den Status von *P. gallaeciensis* CIP 105210 als Typstamm dokumentieren konnten. Durch die unabhängige Hinterlegung der Stämme am CIP und an der DSMZ, ist die wahrscheinlichste Erklärung, dass der spätere Stamm bei der Hinterlegung verwechselt wurde. Forschungslabore sind normalerweise nicht ausreichend ausgestattet, um die Identitäten ihrer Stämme zu verifizieren. Mikrobiologische Sammlungen müssen mit den Hinterlegungen von vertauschten oder kontaminierten Stämmen zurecht kommen und die Qualität des eingehenden Materials wird sich mutmaßlich weiterhin, durch den Rückgang von grundlegenden mikrobiologischen Methoden in der Ära der Molekularbiologie, mindern. Probleme sind, insbesondere bei der Verwechslung von eng verwandten Stämmen, wie bei DSM 17395, der zu der Schwesterspezies gehört, zu erwarten. Deswegen ist es dringend anzuraten, dass Forscher, die an einem bestimmten Stamm arbeiten, exakt die Quelle desjenigen bezeichnen. Dabei sollten die Aufnahme-nummer der Sammlungen (wie *CIP 105210^T* oder *DSM 17395*) den Bezeichnungen der Originalhinterlegern (wie *BS107^T*) bevorzugt werden, unabhängig der Bezugsquelle. In jedem Fall sollten nur Stämme mit einer nachweisbaren Historie in seriösen Forschungsstudien verwendet werden. Die drei homologen Plasmide der vollständig sequenzierten *P. inhibens* Stämme DSM 17395 und DSM 24588 zeigen weitreichende Syntänien [TKV⁺12], jedoch auch einige Insertionen bzw. Deletionen, die verantwortlich für die Abweichungen der Plasmidgrößen sind [262 versus 238 kb (DnaA-like Replikon [PBB⁺11]), 75(78) versus 94 kb (RepB-I), 65(63) versus 70 kb (RepA-I)]. Homologien dieser Replikons könnten auch in der Schwesterspezies *P. gallaeciensis* CIP 105210^T vorhanden sein, zum Beispiel bei den 253, 77 und 64 kb großen Replikons. Hingegen

könnten die auffällig unterschiedlichen Plasmidprofile in *P. gallaeciensis* und *P. inhibens* auf einen horizontalen Gentransfer von vier zusätzlichen Replikons in *P. gallaeciensis* CIP 105210^T hindeuten. Die gleiche Erklärung dient für das Typ-IV-Sekretionssystem auf dem vierten 86 kb großen Plasmid des Typstamms *P. inhibens* DSM 16374^T [DVT⁺13], die für die Plasmidmobilisierung via Konjugation verantwortlich sein könnte [PFGP13]. In Zukunft werden Genomsequenzierungen und vergleichende Genomik von entfernt verwandten Stämmen, wie *Phaeobacter arcticus* helfen, das Ausmaß von horizontalem Gentransfer und vertikaler Evolution der *Roseobacter*-Klade zu entschlüsseln.

1.2.2 Stamm *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 als Modellorganismus

Phaeobacter inhibens DSM 17395 wurde erstmals von Ruiz-Ponte *et al.* [RPCLN98] 1998 beschrieben. Isoliert von einer Jakobsmuschel *Pecten maximus* im Larvenstadium in Galicien (Spanien) und zunächst unter dem Namen *Roseobacter gallaeciensis* geführt, wurde der Stamm 2006 als *Phaeobacter gallaeciensis* BS107 reklassifiziert [MHP⁺06]. Nach Auffälligkeiten zur eindeutigen Identität des Stammes (beschrieben im vorangehenden Abschnitt), emendierten wir 2013 den Stamm erneut und reklassifizierten ihn zu *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 [BPG⁺13].

Der Stamm *P. inhibens* DSM 17395 hat eine charakteristische braune Farbe, die mit dem 262 kb großen extrachromosomalen Element korreliert [PBB⁺11] und sich auf einen TDA-Eisen-Komplex zurück führen lässt [WNSH⁺17]. Er ist strikt aerob und chemoheterotroph, formt eiförmige Stäbchen mit einer durchschnittlichen Breite von 0,5 Mikrometern, sowie einer Länge von 1,6 Mikrometern und ist frei beweglich durch flagellaren Antrieb (Abbildung 1.2).

Die generellen Wachstumsbedingungen bedingen eine NaCl-Konzentration im Rahmen von 0,01 bis 1,5 M, einen pH-Bereich von 6,0 bis 9,5 und einen Temperaturbereich von 4 bis 37 Grad Celsius. Obwohl *P. inhibens* Nitratreduktase, Amylase, Tweenase und Gelatinase negativ ist, verwendet die Spezies eine umfassende Auswahl von Substraten, von Aminosäuren, Zuckern, Disacchariden bis zu Carboxylaten [MHP⁺06] [FMP⁺15]. Der primäre Anabolismus sowie Katabolismus wurde unter anderem mittels phänotypischer MicroArray-Analyse, Proteomanalyse und Gaschromatographie untersucht [WHW⁺14] [DHT⁺14] [BPG⁺13] [ZTS⁺09]. Auch der Sekundärmetabolismus wurde bereits hinsicht-

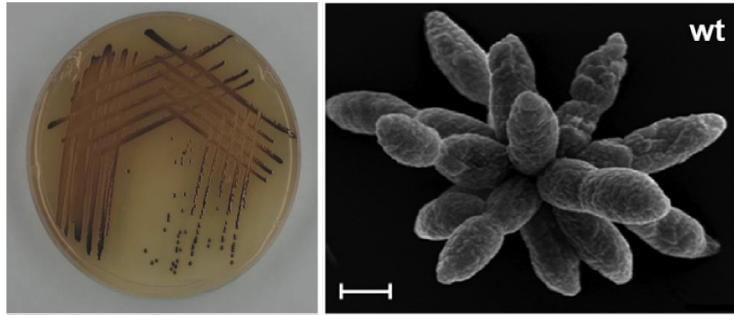


Abbildung 1.2: *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 Wildtyp (wt); braun pigmentierte Zellen auf einer Agar-Platte (links), rosettenförmige Anordnung durch Elektronenmikroskopie (SEM) dokumentiert (rechts, [FMP⁺15]). Scale bar, 0.5 Mikrometer

lich der Fähigkeit zur Antibiotikasythese *Antibiotic Tropodithietic Acid* (TDA) [GBN⁺08] [BBL⁺12] und den Metaboliten zu symbiotischen Interaktionen, z.B. Roseobactizide (Phenylacetyl-CoA als Vorstufe von TDA und Tropolon als Intermediat in der TDA-Synthese) oder das von Algen synthetisierte Dimethylsulfoniopropionat (DMSP) [SCKC11a] [DZB10], weitergehend erforscht. Der reklassifizierte Artname *P. inhibens* leitet sich von dem lateinischen Begriff *inhibere* ab, was übersetzt *anhalten*, *hindern*, *aufhalten* bedeutet; charakteristisch für die Fähigkeit des Stammes das Antibiotikum TDA zu synthetisieren. In Symbiose mit Algen verhindert das Antibiotikum, bzw. Vorstufen und Intermediate, bakterielle Infektionen zur Blütezeit und wird durch ligninhaltige Abbauprodukte der seneszenten Algenblüte hoch reguliert. Dabei verändert der bakterielle Symbiont sich von einer mutualistischen zu einer pathogenen Lebensform und fördert den Kollaps der Algenblüte [SCKC11a] [TKV⁺12].

Die Bakterienstämme der *Roseobacter*-Klade *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 sowie *Dinoroseobacter shibae* DFL12^T werden in zahlreichen Forschungsgruppen weltweit (z.B. in Deutschland, Schweden, Dänemark, USA, Canada, China) als Modellorganismen verwendet, weil sie ein breites metabolisches Spektrum aufweisen, sich gut unter definierten Laborbedingungen kultivieren und genetisch manipulieren lassen.

1.2.3 Die extrachromosomalen Elemente von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395

Extrachromosomale Elemente (ECE) sind in der *Roseobacter*-Klade omnipräsent. *Marinovum algicola* DSM 898 beinhaltet sogar elf ECE [FGPP15], was die Bedeutung der genetischen Informationen, die auf den ECE kodieren, in Bezug auf den Anteil des gesamten Genoms des Organismus, deutlich hervorhebt.

Das Genom von *P. inhibens* DSM 17395 beinhaltet ein 3,8 Millionen Basenpaare (bp) langes Chromosom und drei extrachromosomale Elemente der Größen 65 kbp, 78 kbp und 262 kbp. Der GC-Gehalt und die Codon-Bias der drei extrachromosomalen Elemente sind vergleichbar zu denen des Chromosoms [HLKY10]. Sie wurden als Chromide klassifiziert [PFGP13].

Das größte Chromid (262 kb) erregte durch den genetischen Code zu der Synthese von *Antibiotic Tropodithietic Acid* (TDA) als erstes das Interesse der Forschergruppen [BBH⁺04] [GBN⁺08] [BBL⁺12] [DZB10] [PWN⁺11] [BND14]. Des Weiteren liegen auf dem Chromid Gene, die essentiell für die braune Pigmentierung des Bakteriums sind [TKV⁺12], genauer für einen TDA-Eisen-Komplex [WNSH⁺17]. Die sogenannte *plasmid burden* [FLC14], assoziiert mit energetischen Zusatzbelastungen, hat, nach Trautwein *et al.* [TWH⁺16], bei dem größten Chromid den größten Einfluss. Die Deletion verstärkte die Wachstumsrate (mehr als dreifach) und die Wachstumseffizienz (für Kohlenstoff, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid), was für die 65 kb und 78 kb ECE nicht beobachtet werden konnte. Dieses Phänomen lässt sich darauf zurück führen, dass sich das Bakterium durch die TDA-Synthese selbst inhibiert. Dies geschieht auf Grund einer partiellen Zerstörung des Protonengradientens, der zu einer höheren energetischen Leistung führt. [WNSH⁺17]

Das mittlere Chromid (78 kb) beinhaltet ein Gencluster zur Biosynthese und zum Transport von Eisen-chelatierenden Siderophoren [TKV⁺12]. Eisen ist einer der größten limitierenden Faktoren und essentielle Baustoff für mikrobielles Leben. Neben der essentiellen Notwendigkeit für den Metabolismus, spielen Siderophoren bei einigen Bakterien eine kritische Rolle für die Pathogenität und die Biofilmbildung [SSDB13].

Das mit 65 kb kleinste Chromid ist ausgesprochen bedeutungsvoll für symbiotische Interaktionen und die Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Habitate. Durch dieses Chromid ist *P. inhibens* DSM 17395 in der Lage Biofilme

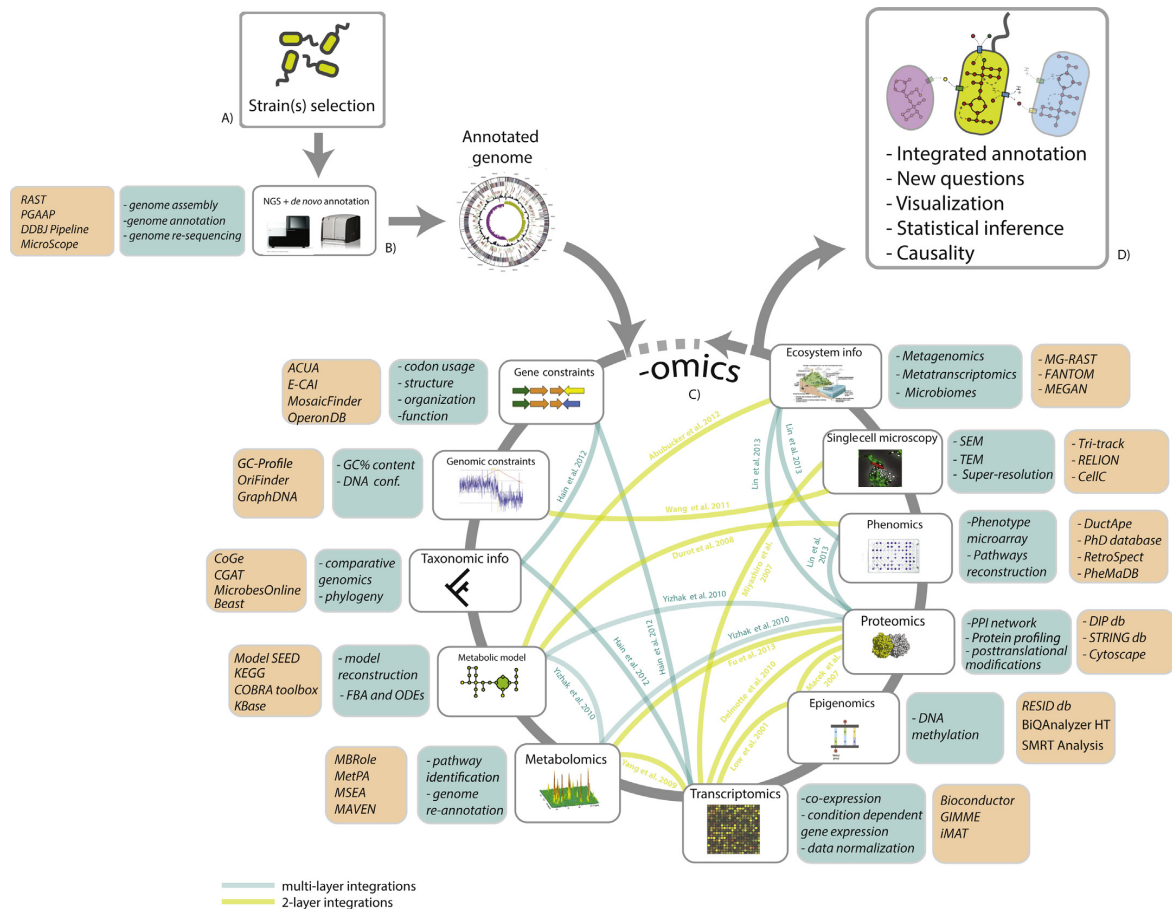


Abbildung 1.3: Datenvernetzung in mikrobielle *-omics Pipelines* [FL15]. Die orangenen Kästchen enthalten die mögliche Software, während die blauen Kästchen spezifische Anwendungen der generellen *-omics* Strategie enthalten.

zu bilden. Auf dem Chromid kodieren mehr als 20 Gene des Polysaccharid-metabolismus, unter anderem ein Rhamnose-Operon. Ohne das Chromid verliert das Bakterium seine Klebrigkeit und kann weder an künstlichem Material (Glass, Polystyren) noch an natürlichen Oberflächen (Algen) anheften und verliert folglich seine Fähigkeit Biofilme zu bilden [FMP⁺15]. Zusätzlich verliert solch eine Mutante die Fähigkeit der flagellaren Schwimmtotilität, die für eine Oberflächenbesiedlung und Ausbreitung von Biofilmen, notwendig ist.

1.3 Datenanalyse in den Lebenswissenschaften

Die Datenanalyse hat in den Lebenswissenschaften längst eine prominente Rolle angenommen. Die Biologie als Wissenschaft generiert, besonders durch die Hochdurchsatz *-omics* Datensätze, enorme Datenmengen. Hochdurchsatz-

Studien von biologischen Systemen akkumulieren sehr schnell umfangreiche *omics*-skalierte Datensätze [GOB⁺10]. Fondi *et al.* [FL15] gibt zu der Integration der akkumulierten Datensätze in mikrobielle *omics-Pipelines* eine aktuelle Übersicht, Abbildung 1.3: (A) Stammisolationen und vorläufige experimentelle Charakterisierungen führen normalerweise zur Identifikation/Selektion der Bakterien, die von potentiell Interesse in der Biotechnologie sein können. (B) Um eine systemrelevante Perspektive von biotechnologisch interessanten Stämmen zu erhalten, wird meist eine vorläufige Genannotation durchgeführt. Im nächsten Schritt kann man Informationen über die Präsenz bzw. dem Fehlen von metabolischen Stoffwechselwegen und umfassende metabolische Möglichkeiten erhalten. (C) Um systemrelevante Informationen zu erhalten kann zusätzliche Information zu der Genannotation abgebildet werden (das *omics-Werkzeug*). Das beinhaltet Gene und genomische Bedingungen (abgeleitet von einer tiefgehenden Untersuchung der genomischen Charakteristika), taxonomische und metabolomische Informationen, *omics*-Daten (*Transcriptomics*, *Proteomics*, *Metabolomics*, *Epigenomics*, *Phenomics*), weitere phänotypische Informationen (z.B. hochauflösende Mikroskopie), Informationen zum Ökosystem (mikrobiome Zusammensetzungen, funktionelle Charakteristika von Artengemeinschaften, *Meta-Transcriptomics*). Des Weiteren können diese vielschichtigen Informationen kombiniert und integriert werden, um Datensätze, die aus der Anwendung der verschiedenen Technologien resultieren, zusammenzuführen. (D) Nachdem die *omics*-Daten integriert wurden, entsteht ein noch umfassenderes Bild der Mikrobe(n) der Studie mit Anhaltspunkten zu den möglichen Interaktionen zur Umwelt (inklusive metabolischer Kommunikation mit anderen mikrobiellen Spezies), statistisch fundierter Rückschlüsse und neue Fragestellungen (möglicherweise reiterativ in der Pipeline). Darüber hinaus erfordern solch umfangreiche Datensätze eine Art der Darstellung. Über die Möglichkeiten zur Visualisierung in der Vergangenheit, der Gegenwart und der Zukunft geben Pavlopoulos *et al.* [PMP⁺15] in ihrer Studie eine umfassende Übersicht.

1.4 Phänotypische Analyse

Die phänotypische MicroArray-Technologie (PM) dient zur Generierung von longitudinalen Daten, die die Modellierung des individuellen Verhaltens in Gruppen von Individuen über einen Zeitraum anstrebt [VSM⁺12]. Die PM-

Technologie ist die erste Hochdurchsatz-Technik für den Phänotyp (altgriechisch für *ich erscheine* und *Gestalt*). Der Begriff *Phänotyp* beschreibt einen Organismus in seiner Gesamtheit - alle Aspekte des äußeren Erscheinungsbildes, der Anatomie, der Physiologie und des Verhaltens. Gleichmaßen steht der Begriff *Genotyp* für das gesamte Genom eines Organismus und nicht nur für die Allele eines einzelnen Genortes. In den meisten Fällen wird die phänotypische Ausprägung eines Gens durch andere Gene und die Umwelt beeinflusst. Der Genotyp bestimmt also die Reaktionsnorm (Schwankungsbreite), in welcher der Phänotyp variieren kann. Die phänotypische Ausprägung hängt dabei von der betreffenden Umwelt ab. In dieser Gesamtschau von Vererbung und Variabilität, spiegelt der Phänotyp eines Organismus seinen gesamten Genotyp und seine Umweltsituation wider. [CRM03]

Das phänotypische MicroArray-System ermöglicht die Generierung einer großen Anzahl von Phänotypen als Hochdurchsatz-System. Die Anwendung basiert auf einer physiologischen Reaktion des getesteten Organismus, die NADH erzeugt, das ein Redoxpotential und einen Elektronenfluss auslöst, der einen Tetrazolium-Farbstoff reduziert: Tetrazolium-Violett, siehe Abbildung 1.4. Dadurch wird eine violette Farbe erzeugt [BS77]. Je größer die metabolische Aktivität dabei ist, z.B. die zelluläre Respiration, desto schneller intensiviert sich der violette Farbstoff [Boc01] [Boc09]. Das OmniLog-PM-System zeichnet die Veränderung der Farbintensität alle 15 Minuten in einem automatisierten Verfahren auf. Das Spektrum der zu testenden Varianten reicht von 190 Kohlenstoffquellen über 95 Stickstoffquellen, 95 Phosphat- und Schwefelquellen, 95 Tests zu Biosynthese Stoffwechselwegen, 285 Tests zu Stickstoff-Stoffwechselwegen, 95 Tests zu variierenden osmolytischen Konzentrationen, 95 Tests zu variierenden pH-Konzentrationen und 960 Tests zu der konzentrationsabhängigen Sensitivität gegenüber 240 unterschiedlichen Chemikalien [Boc01] [Boc09]. Weitergehend können die Bedingungen durch die Modifikation der Temperatur oder der Komposition der Gasphase sowie des Mediums vorgenommen werden.

Die Fa. Biolog stellt zusätzlich eine Software zur Verfügung, die der Datenauswertung dienen soll. Leider ist sie in ihren Möglichkeiten beschränkt auf die einfache Darstellung der kinetischen Respirationen mit maximal einer Vergleichsmöglichkeit. Da die Visualisierung der Schlüssel zur Analyse und zum Verständnis von hochdimensionalen Datensätzen darstellt [GOB⁺10], war eine verbesserte Möglichkeit zur PM-Datenanalyse der Antrieb für die Entwicklung

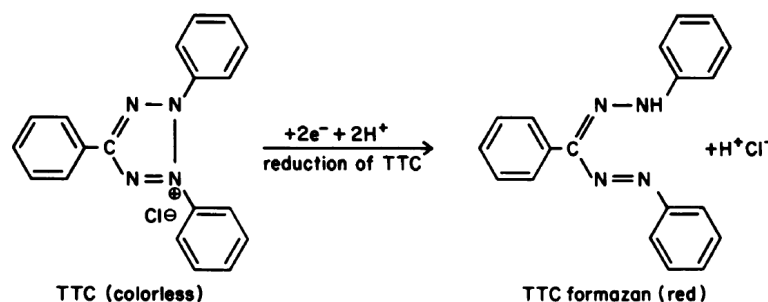


Abbildung 1.4: Struktur und Reduktion von Tetrazolium [BS77]

einer neuen Software. Dafür wurde unter anderem in dieser Studie ein *R* Paket *opm* entwickelt, das eine statistische sowie graphische Auswertung der Datensätze des phänotypischen MicroArrays ermöglicht [VSH⁺13]. Darüber hinaus wurde für hochdimensionalen Datensätze ein *R* Paket *stabs* entwickelt, das eine stabile Auswahl mit mehr Wirkungsvariablen als Beobachtungswerten für lineare und generalisierte lineare Modelle (genauer *generalized additive models* (*GAM*)) implementiert [HBG15].

1.5 Zielsetzung

Meeresbakterien, insbesondere die Stämme *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 und *Dinoroseobacter shibae* DSM 16493^T sind in vielen aktuellen Studien die Modellorganismen, die bezüglich ihrer Genomik, Phylogenie oder ihrer metabolischen Aktivität erforscht werden. Wie sich der Phänotyp jedoch gegenüber mehr als tausend unterschiedlichen Kohlenstoffquellen und Chemikalien verhält, ist Gegenstand dieser Studie. Mittels Labor- und phänotypischen MicroArray-Experimenten sowie *in silico*-Analysen wurde der Modellorganismus *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 unter Berücksichtigung der extrachromosomalen Elemente untersucht. Dazu war zunächst eine Systematisierung der *Phaeobacter*-Stämme notwendig, um den Modellorganismus zweifelsfrei zu identifizieren und zu reklassifizieren, sowie in Beziehung zu seinen Verwandten zu setzen. Anschließend wurde ein Datenset mittels phänotypischer MicroArray-Technologie etabliert, das zum Ziel hatte, heraus zu finden, wie sich der Phänotyp gegenüber 1.190 unterschiedlichen Substanzen verhält. Um das große phänotypische Spektrum des Stammes zu analysieren, musste zunächst eine Software entwickelt werden, die die Möglichkeit zu einer Auswer-

tung bieten konnte. So entstand das *R*-Paket *opm*, das zahlreiche, statistisch abgesicherte Möglichkeiten zur Auswertung der PM-Daten ermöglicht. Zusätzlich wurden die 1.190 Substrate der PM-Mikrotiterplatten in Klassen und Superklassen eingeteilt. Darüber hinaus wurde jedem Substrat eine Beschreibung oder/und ein *Review*-Artikel zugeordnet, um eine inhaltliche Analyse zu ermöglichen und die Einordnung der mannigfaltigen Substrate zu vereinfachen. Durch die Ergebnisse der Analyse via *opm* konnten neue Erkenntnisse zum phänotypischen Verhalten von *P. inhibens* DSM 17395 gewonnen werden, die in Zusammenhang mit dem Genotyp gebracht wurden. Zusätzlich wirft es neue Fragestellungen zu der chemischen Zusammensetzung der Habitate des Bakteriums auf.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Ausstattung und Instrumente

Die Ausstattung und Instrumente dieser Studie sind in Tabelle 2.1 gelistet.

2.2 Verbrauchsmaterial

Das Verbrauchsmaterial dieser Studie ist in Tabelle 2.2 gelistet.

2.3 Chemikalien

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien, wurden von den folgenden Herstellern bezogen: AES Chemunex (Bruchsal), CS GmbH (Langerwehe, Deutschland), DIFCO (Lawrence, KS, USA), Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland).

2.4 Bakterienstämme

Die Bakterienstämme dieser Studie sind in Tabelle 2.3 gelistet. Die Stämme wurden direkt aus dem *Leibniz-Institut DSMZ – Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* entnommen, oder in der Arbeitsgruppe Pradella/Petersen (*Leibniz-Institut – DSMZ*) mutiert.

Tabelle 2.1: Ausstattung und Instrumente

Equipment	Hersteller
Analysenwaage LP620P	Sartorius (Göttingen)
Autoklav Varioklav 65T	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Bakterienschüttler mit Heizhaube	Infors (Bottmingen, Schweiz)
Kreisschüttler GFL-3015	Omnilab (Mettmenstetten)
Magnetrührer IKA RET basic C	IKA Werke (Staufen im Breisgau)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss AG (Göttingen)
Neubauer Zählkammer	Brand (Gießen)
OmniLog-Incubator/Reader	Biolog (Hayward, CA, USA)
pH-Meter 766	Knick (Berlin)
Photometer Ultrospec II	LKB-Biochrom, Merck (Berlin)
Sterilbank HERAsafe	ThermoScientific (Karlsruhe)
Tecan-Microplate-Reader	Infinite® 200 PRO (Männedorf, Schweiz)
Turbidimeter AES Chemunex BLG 3531	Biolog (Hayward, CA, USA)
Vortex Vibrofix VF1	Janke und Kunkel IKA Labortechnik (Staufen im Breisgau)
Wärmeschrank	Memmert (Schwabach)
Wasserbad HB4 basic	IKA Werke (Staufen im Breisgau)
Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Deckgläser	Engelbrecht (Edermünde)
Eppendorfcups (1,5 ml/ 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Erlenmeyer-Kolben 100, 300, 500 and 1000 ml	W. O. Schmidt Laboratoriumsbedarf, (Braunschweig)
Küvetten, Polystyrol, 1.5 ml	Sarstedt (Nürnberg)
Mikrotiterplatten Micro Well	Nunc (Langenselbold)
Multiwell-Platten (6, 12, 24, 48 und 96)	Greiner (Frickenhausen)
Objektträger (geschnitten, Matt-Rand)	Engelbrecht (Edermünde)
Parafilm	Bemis über Carl Roth (Karlsruhe)
Petrischalen	Sarstedt (Nürnberg)
Phenotypic Microarray-Platten TM	AES Chemunex (Bruchsal)
Pipettenspitzen, 10, 200, 1000, 1200, 5000, 10000 Mikroliter	Eppendorf (Hamburg) oder Sarstedt (Nürnberg)
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Sterilfilter 0,2 Mikrometer	Sarstedt (Nürnberg) oder Sartorius (Göttingen)
Zellkulturflaschen BD Falcon	BD Biosciences (Heidelberg)

Tabelle 2.3: Bakterienstämme; das hochgestellte ^T definiert den jeweiligen Stamm als Typstamm

Gattung und Art	Stamm	Beschreibung
<i>Phaobacter inhibens</i>	DSM 17395	Wildtyp (wt)
<i>Phaeobacter inhibens</i>	Δ 262kb	Mutante ohne 262 kb-Chromid
<i>Phaeobacter inhibens</i>	Δ 65kb	Mutante ohne 65 kb-Chromid
<i>Phaeobacter inhibens</i>	Δ 262kb_ Δ 65kb	Mutante ohne 262 kb- und ohne 65 kb-Chromid
<i>Phaeobacter inhibens</i>	DSM 16374 ^T	Wildtyp
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	CIP 105210 ^T (DSM 26640 ^T , BS107 ^T)	Wildtyp
<i>Roseobacter denitrificans</i>	DSM 7001 ^T	Wildtyp
<i>Roseobacter litoralis</i>	DSM 6996 ^T	Wildtyp
<i>Dinoroseobacter shibae</i>	DSM 16493 ^T	Wildtyp
<i>Marinovum algicola</i>	DSM 10251 ^T	Wildtyp
<i>Marinovum algicola</i>	DSM 27768 (DG898)	Wildtyp

Tabelle 2.4: *Basic A* Stocklösung (Salzlösung) (10x)

Chemikalie	Menge [g/L]
Na ₂ SO ₄	40
KH ₂ PO ₄	2
NH ₄ Cl	2,5
NaCl	200
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	30
KCl	5
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,5

Tabelle 2.5: *Basic B* Stocklösung (Puffer) (100x)

Chemikalie	Menge [g/L]
NaHCO ₃	19

2.5 Medien und Supplemente

Zur Herstellung der Medien und Lösungen wurde salzfreies, partikel- und sterilgefiltertes ultra-pur-Wasser von einer Millipore-Anlage MilliQ (Millipore, Schwalbach) verwendet. Die Sterilisation der Medien wurde für 20 min bei 212 °C und 1 bar Druck durchgeführt.

2.5.1 Komplexmedium Marine Broth

Marine Broth als Komplexmedium wurde von den Herstellern DIFCO und Carl Roth verwendet. DIFCO 2216 37,1 g/L bzw. Roth Marine Bouillon CP73.1 40,1 g/L. Für feste Medien wurde 15 g/L Agar vor dem Autoklavieren hinzu gefügt.

2.5.2 Minimalmedium Salzwasser

Das *Minimalmedium Salzwasser* wurde mit minimalen Modifikationen nach [ZTS⁺09] hergestellt. Es besteht aus den Komponenten: *Basic A* (Salzlösung) (Tabelle 2.4), *Basic B* (NaHCO₃) (Tabelle 2.5), *Stocklösung Vitamine* (Tabelle 2.6), *Stocklösung Spurenelemente* (1000x) (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.6: *Stocklösung Vitamine (100x)*

Chemikalie	Menge [mg/L]
Thiamin	100
Niacin	20
4-Aminobenzoessäure	8
Biotin	2

Tabelle 2.7: *Stocklösung Spurenelemente (1000x)*

Chemikalie	Menge
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	144 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
Fe(II)SO ₄ x 7 H ₂ O	2,1 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mg

2.5.3 Phänotypisches MicroArray-Inokulationsmedium

Das Inokulationsmedium variiert je nach Plattentyp. PM01 und PM02 wurden auf Grund der zu testenden Kohlenstoffquelle ohne Kohlenstoffquelle im Medium inkubiert, Inokulationsmedium 1 (IF-0), siehe Tabelle 2.8. PM10 bis PM20 wurde durch die zu testende Toleranz gegenüber der jeweiligen Substanz/ Chemikalie mit Kohlenstoffquelle inkubiert. Dazu wurde statt dem Inokulationsmedium 1 (IF-0) das Inokulationsmedium 2 (IF-10) mit Kohlenstoffquelle verwendet, Tabelle 2.9.

2.6 Methoden zum Phänotyp

Zur Eruierung des Phänotyps von *P. inhibens* DSM 17395 und den zugehörigen Chromid-Mutanten wurden ein phänotypisches MicroArray sowie ein Biofilmassay angewendet, deren Methodik im Folgenden beschrieben wird. Die Bakterienauswahl wurde für die Methode des Biofilmassays mit den Bakterienstämmen aus Tabelle 2.3 ausgeweitet.

Tabelle 2.8: *Biolog Inokulationsmedium 1, PM01 und PM02*

Chemikalie	Menge
IF-0a GN/GP (1.2x) (AES Chemunex)	10 mL
Basic A (7.5x)	1200 μL
Stocklösung Vitamine	120 μL
Stocklösung Spurenelemente	12 μL
Basic B	120 μL
Aqua _{dest}	428 μL
Redox-Dye-Mix D (100x) (AES Chem.)	120 μL

Tabelle 2.9: *Biolog Inokulationsmedium 2, PM10-PM20*

Chemikalie	Menge
IF-10a GN/GP (1.2x) (AES Chemunex)	10 mL
Basic A	1200 μL
Stocklösung Vitamine	120 μL
Stocklösung Spurenelemente	12 μL
Basic B	120 μL
Aqua _{dest}	428 μL
Redox-Dye-Mix D (100x) (AES Chem.)	120 μL

2.6.1 Biofilmassay

Ein bakteriell gebildeter Biofilm kann mit Hilfe eines *Biofilmassays* quantifiziert werden. Modifiziert nach dem Protokoll von O´Toole und Kolter [OK98] wird der Biofilm in 96-Well-Platten mittels Kristallviolett detektiert.

Die *Phaeobacter*-, *Roseobacter*-, *Dinoroseobacter*- und *Marinovum*-Stämme, siehe Tabelle 2.3, wurden in 10 mL MB-Medium in Erlenmeyerkolben bei 28 °C mit kräftiger Schüttelbewegung angezogen. 100 μ L dieser Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,065 verdünnt und in eine sterile 96-Well-Mikrotiter-Platte aus Polystyren pipettiert (Corning, Costar 3370). Die statische Inkubation fand ebenfalls bei 28 °C für 24 Stunden statt. Das Medium mit den verbleibenden planktonischen Zellen wurde verworfen und zweimal mit 200 μ L H₂O gewaschen. Die Anfärbung wurden 200 μ L einer 0,1% Kristallviolett-Lösung in jedes Well pipettiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Kristallviolett-Lösung entfernt und jedes Well wurde abermals zweifach mit H₂O gewaschen, um die verbleibende Lösung zu entfernen. Zur Auswertung der Zellanheftung wurde die Kristallviolett-Färbung mit 200 μ L 95% Ethanol von dem gebildeten Biofilm extrahiert und 100 μ L wurden in eine neue 96-Well-Platte transferiert. Die Absorptionsgrad wurde bei 600 nm mittels eines Tecan-Microplate-Readers (Infinite® 200 PRO) ermittelt. Die Ergebnisse des Biofilmassays wurden statistisch analysiert. Die Daten von jeweils drei biologischen und drei technischen Replikaten jedes Experiments wurden in Boxplots visualisiert. Dazu wurde die statistische Analyse-Software R (Version 3.1.1) verwendet.

2.6.2 Phänotpisches MicroArray (PM) der Fa. Biolog

Kultivierungsbedingungen

Die *Phaeobacter*-Stämme, als Wildtyp und Chromid-Mutanten, siehe Tabelle 2.3, wurden auf MB-Agar-Platten ausgestrichen und für 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Von diesen Kulturen wurden mit einem sterilen Wattestäbchen Kolonien gepickt und in ein Reagenzglas mit 6 mL Biolog-Inokulationsmedium suspendiert, um eine Zelldichte von 85 % T (Transmission) zu erreichen. Die Einstellung der Turbidität erfolgte im Turbidimeter (AES Chemunex). Die Zellsuspension wurde zu 100 μ L/Well pipettiert. Die Platten wurden mit Para-

film umwickelt und für mindestens 72 Stunden bei 28 °C im Omnilog-Incubator/Reader gemessen. Alle 15 Minuten wurden automatisiert Fotos der Platten aufgenommen, um den Farbumschlag zu dokumentieren und umzurechnen. Die Daten wurden mittels der Software OmniLog-OL-PM/FM ausgelesen und mit dem R-Paket *opm* analysiert.

Datensatz

Das experimentelle Design der Studie für das phänotypische MicroArray bestand aus folgenden Datenset der PM-Mikrotiterplatten der Fa. Biolog: PM 01 und PM 02A als Triplikat; PM 10, PM 11C, PM 12B, PM 13B, PM 14A, PM 15B, PM 16A, PM 17A, PM 18C, PM 19 und PM 20B jeweils als Duplikat.

Diese Varianten wurden jeweils für den Wildtyp und die drei Chromid-Mutanten von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, siehe Tabelle 2.3, durchgeführt. Zusätzlich wurde mit jedem PM-Plattentyp eine Negativkontrolle mit dem Inokulationsmedium ohne Bakterien durchgeführt, um falsch positive Ergebnisse zu extrahieren. Das ergab folgende Messpunkte:

PM01-02: 4 Bak.stämme x (96 x 2 PM-Platten) ergaben 768 Ergebnisse
 768 x 3 Replikate ergaben 2.304 Ergebnisse
 2.304 x 280 Messpunkte ergaben 645.120 Messpunkte
 plus Negativkontrollen: 53.760 Messpunkte für 2 PM-Platten
PM10-20: 4 Bak.stämme x (96 x 11 PM-Platten) ergaben 4224 Ergebnisse
 4.224 x 2 Replikate ergaben 8.448 Ergebnisse
 8.448 x 280 Messpunkte ergaben 2.365.440 Messpunkte
 plus Negativkontrollen: 295.680 Messpunkte für 11 PM-Platten
Gesamt 12.000 Ergebnisse; entspricht 3.360.000 Messpunkten

2.7 Statistische Datenanalyse der PM-Ausgabedateien

2.7.1 R-Paket *opm*: Entwicklung eines geeigneten Programms zur Auswertung von phänotypischen MicroArray-Daten

Die Visualisierung und die statistische Auswertung sind ein Kernaspekte der Analyse und des Verständnisses von Daten [GOB⁺10]. Zwar bietet die Firma Biolog mit ihrer Analysesoftware *OmniLog-OL-PM/FM und OL-PM/Par*

(jeweils Version 1.20.02) die Möglichkeit einer Auswertung, die beispielsweise von Xue *et al.* genutzt wurde [XSB⁺11], jedoch ausschließlich für visuelle Plots in geringer Auflösung und mangelnden Vergleichsmöglichkeiten. So entwickelten wir an der DSMZ ein R-Paket *opm* zur statistischen Auswertung von PM-Daten.

Mein Anteil am *opm*-Paket war die systembiologische Einteilung der PM-Substrate und die Integrierung der Dokumentation in das Paket (mit Markus Göker); d.h. Einordnung der 1.190 PM-Substrate in Klassen und Superklassen, inhaltliche Erläuterungen/ Erklärungen zu einzelnen Substraten, Literaturvorschläge zu Substratklassen (Reviews), Synonyme, IDs zu Substratklassen, Literatur: PubMedID, Digital-Object-Identifier (DOI), CAS-Nummern; sowie die Entwicklung neuer Grafiken, die die systembiologische Einteilung der Substrate sinnvoll nutzen.

2.7.2 Datenmanagement mittels *opm*

Datenexport

Die longitudinalen PM-Daten (3,36 Mio Messpunkte) können aus dem OmniLog-Incubator/Reader der Fa. Biolog als csv-Dateien exportiert werden. Das *opm-Paket* bietet die Option die csv-Dateien auszulesen.

Metadaten

Nachdem die Rohdaten als csv-Dateien in das *opm-Paket* eingelesen wurden, können die Metadaten aufgenommen und mit den Rohdaten vereinigt werden. Dabei wurde eine Vereinheitlichung der Messdauer auf 70 Stunden (also 2,9 Tage, 4 Messpunkte pro Stunde mal 70 Stunden ergibt 280 Messpunkte) angewandt.

2.7.3 Methodik – Diskriminanzanalyse

Das Datenset wurde durch eine Diskriminanzanalyse ausgewertet. Die Diskriminanzanalyse ist eine Methode der multivariaten Verfahren in der Statistik und dient der Unterscheidung von zwei oder mehreren Gruppen, die mit mehreren Merkmalen beschrieben werden [Tat71].

Dazu wurde für jede Messung der Kurvenparameter A (max. height) berechnet. Zur weiteren Analyse wurden Matrizen mit den A-Werten erstellt. Mittels

einer partitionierten Analyse mit *k-means* (R Paket mit Algorithmen zur Auswertung von Mittelwerten), das in das *opm* Paket integriert wurde, auf Basis der Maximalwerte (A), wurden die Daten in negative (0), unklare (1) und positive (2) Reaktionen diskretisiert, siehe Abbildung 2.1. Durch die Auswahl der untersuchten *Phaeobacter*-Stämme (Wildtyp und Chromid-Mutanten), siehe Tabelle 2.3, kann mit Hilfe eines logischen Ausschlussverfahrens Rückschluss auf die Bedeutung des jeweiligen extrachromosomalen Elements (Genotyp) für die jeweilige phänotypische Reaktion geschlossen werden. Die Realisierung einer Analyse vom Genotyp zum Phänotyp unter Berücksichtigung der extrachromosomalen Elemente.

2.8 Software

In Tabelle 2.10 ist die verwendete Software dieser Studie gelistet.

2.9 Datenbanken

In sind die verwendeten Datenbanken dieser Studie gelistet.

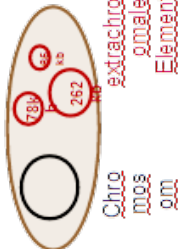
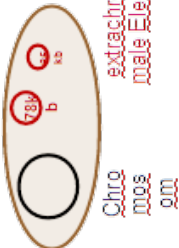
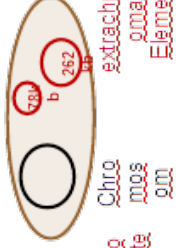
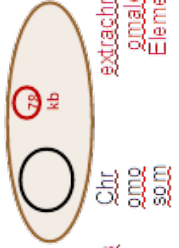
				relevanter genetischer Code für die Reaktion liegt auf:	
				relevanter genetischer Code für die Reaktion liegt auf:	
				relevanter genetischer Code für die Reaktion liegt auf:	
				relevanter genetischer Code für die Reaktion liegt auf:	
Legende: 0 = negativ, 1 = unklar, 2 = positiv					
2	2	2	2	Chromosom	od. pPinh 78kb
2	0/1	2	0/1	pPinh 262kb	
2	2	0/1	0/1	pPinh 65kb	
2	0/1	2	2	pPinh 262kb in Kombination mit pPinh 65kb	
2	2	2	0/1		
2	0/1	0/1	0/1		
0/1	0/1	0/1	2	Sonderreaktionen:	
0/1	0/1	2	0/1	ohne das jeweilige extrachromosomale Element reagiert Bakterium stärker bzw. ist resistenter	
0/1	2	0/1	0/1		
0/1	2	2	0/1		

Abbildung 2.1: Ergebnismöglichkeiten der Diskriminanzanalyse

Tabelle 2.10: Software in dieser Studie

Software	Beschreibung
CorelDraw Graphics Suite (2013) (Corel)	Grafik- und Bildbearbeitungs-Softwaresammlung
Mendeley (Version 1.17.11) (Mendeley Ltd.)	Literaturverwaltungsprogramm
OmniLog-OL-PM/FM und OL-PM/Par (beide Versionen 1.20.02) (Biolog)	Programm zur Datenevaluation und Visualisierung von kinetischen Respirationskurven
OmniLog-PM-DC (Version 1.30.01) (Biolog)	Administrationssoftware für den OmniLog-Inkubator/Leser
OpenOffice (Version 2) (Apache Software Foundation)	Programme zur Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Präsentation und zum Zeichnen
R (Version 3.1.1 for Windows7, and 3.1.0 for MacOS X) (R Foundation for Statistical Computing)	Programm zur statistischen Analyse und Visualisierung von Daten
<i>K-Means Clustering</i>	R Paket mit Algorithmen zur Auswertung von Mittelwerten
<i>opm</i> [VSH ⁺ 13]	R Paket zur Auswertung von phänotypischen MicroArrays (Biolog)
R-Development-Core-Team (2011)	R-Code zur Einstufung von extrachromosomalen Elementen als Chromide oder Plasmide
TeXstudio (Version 2.12.6)	Plattformunabhängiger Editor für die Erstellung von LaTeX-Dokumenten

Tabelle 2.11: Datenbanken in dieser Studie

Datenbanken	Beschreibung
BRENDA [SCP ⁺ 13] (http://www.brenda-enzymes.org)	Datenbank für Enzyme und Liganden
CAS Chemical-Abstract-Service (https://www.cas.org/)	Datenbank für Chemikalien
GESTIS-Stoffdatenbank (www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank)	GESTIS ist das Gefahrstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung
JGI-IMG (https://img.jgi.doe.gov/)	Ganzheitliche mikrobielle Genome und Mikrobiome
KEGG [KGS ⁺ 14] (http://www.genome.jp/kegg)	Datenbank für Stoffwechselwege und Stoffe
MetaCyc [CAB ⁺ 14]	Datenbank für experimentell ermittelte Stoffwechselwege und Stoffe
MeSH-Browser (https://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html)	Datenbank für medizinische Begriffe und Daten
NMPDR- Natural Microbial-Pathogen-Data-Resource; RAST: the Rapid-Annotation-Server [ABB ⁺ 08] (http://www.nmpdr.org/)	RAST: Genomsequenzannotationservice
NCBI <i>National Center for Biotechnology Information</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	Biomedizinische und genetische Informationen
Pharma-Wiki (http://www.pharmawiki.ch/wiki/)	Informationen über Medikamente
Pub-Chem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)	Chemistry Database
UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org/)	Manuell kuratierte Proteindatenbank
wikipedia (http://www.wikipedia.org/)	Freie enzyklopädische Datenbank

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Die Bedeutung der extrachromosomalen Elemente für die Biofilmbildung innerhalb der *Roseobacter*-Klade

3.1.1 Genomik

Das Konzept der Homologie gibt eine biologische sinnvolle Klassifikation von Genen vor. Daher ist das Identifizieren orthologer Gene, d.h. solcher, die von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, Grundlage für viele vergleichende Genomstudien. Basierend auf einem bioinformatischen Ansatz des paarweisen Sequenzvergleichs wurde die COG-Datenbank gegründet. Ein jedes COG–*Cluster-of-Orthologous-Groups* enthält orthologe Proteine oder orthologe Mengen paraloger Proteine aus mindestens drei unterschiedlichen Spezies. Zusätzlich wurden alle COGs in eine von 25 funktionellen Kategorien eingeordnet. [Mer15] Mittels einer COG-Analyse werden das Chromosom sowie die drei extrachromosomalen Elemente des Modellorganismus dieser Studie *P. inhibens* DSM 17395 klassifiziert, siehe Abbildung 3.1 und zugehöriger Tabelle 3.1.

Das Chromosom gruppiert dabei mit dem größten 262 kb-Chromid, gefolgt von dem mittleren 78 kb großen Chromid. Das kleinste 65 kb große Chromid unterscheidet sich am stärksten von den anderen Kompartimenten. Innerhalb dieses Chromids sticht auch die am höchsten eingestufte funktionelle Kategorie *M* hervor, die auf biofilm-assoziierte genetische Information hindeutet. Die selbe Kategorie ist auch auf dem 262 kb großen Chromid vertreten, gefolgt von dem Chromosom. Neben den Kategorien *R* und *S*, deren Funktionen un-

Tabelle 3.1: COG-Kategorien

COG-Kategorie	Beschreibung
A	RNA-Prozessierung und -Modifikation
B	Chromatinstruktur und -dynamik
C	Energieproduktion und -umwandlung
D	Zellzykluskontrolle und Mitose
E	Aminosäurenmetabolismus und -transport
F	Nukleotidmetabolismus und -transport
G	Kohlenhydratmetabolismus und -transport
H	Coenzymmetabolismus
I	Lipidmetabolismus
J	Translation
K	Transkription
L	Replikation und Reparatur
M	Zellwand-/ Membran-/ Hüllenbiogenese
N	Zellmotilität
O	Post-translationale Modifikation, Proteinfaltg., Chaperonfkt.
P	Anorganischer Ionentransport und -metabolismus
Q	Sekundärstrukturen
T	Signaltransduktion
U	Intracellulärer Austausch und Sekretion
V	Abwehrmechanismen
Y	Nuklearstrukturen
Z	Zytoskelett
R	Generelle funktionelle Voraussage
S	unklare Funktion

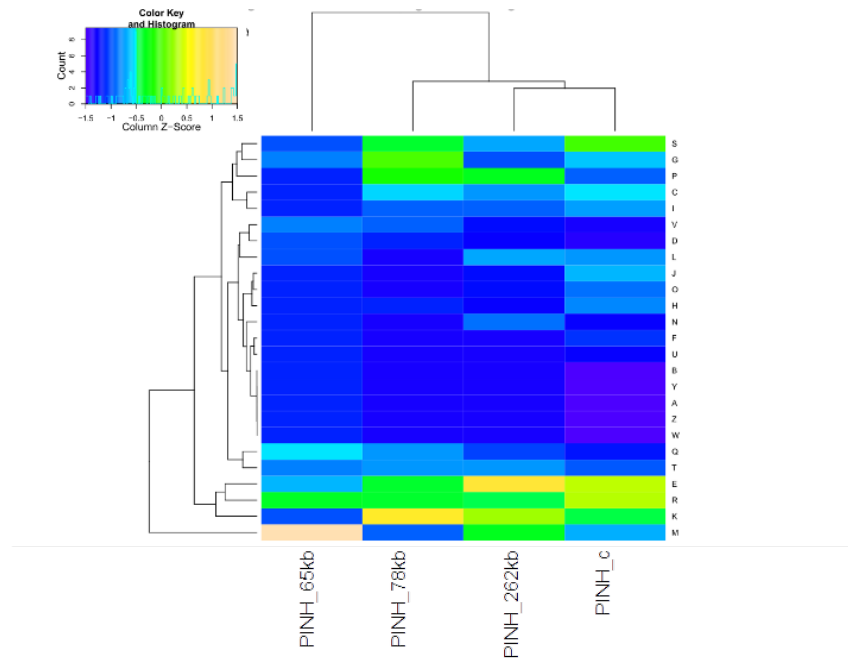
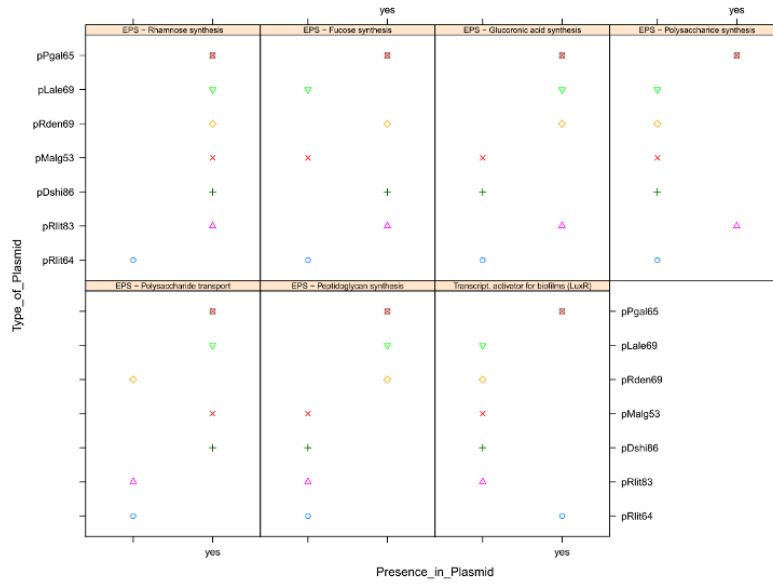


Abbildung 3.1: Klassifizierung der extrachromosomalen Elemente von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 zu den drei Chromiden mittels COG-Kategorien; R-Development.Core-Team (2011)

bekannt sind, stechen noch weitere Kategorien signifikant hervor. Bei dem 78 kb großen Chromid sind die Kategorien *E*, *G* und *C*, die für den Aminosäuren- und Kohlenhydratmetabolismus und -transport, sowie für die Energieproduktion und -umwandlung, stehen, besonders stark vertreten. Des Weiteren die Kategorien *P* für anorganischen Ionentransport und -metabolismus und *K* für die Transkription. Das 262 kb große Chromid ist neben der bereits erwähnten Kategorie *M* sowie *E*, ebenfalls signifikant in den funktionellen Kategorien *P* und *K* vertreten. Für alle Chromide gibt es eine Auffälligkeit in der Kategorie *T* Signaltransduktion. Auf dem Chromosom fällt neben dem Aminosäuremetabolismus und -transport (*C*) ebenfalls die Kategorie Transkription (Kategorie *K*) auf.

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung sticht physiologisch und genomisch signifikant hervor, siehe auch [FMP⁺15]. Da die funktionelle Kategorie größtenteils auf dem Chromid kodiert, stellt sich die Frage, ob innerhalb der *Roseobacter*-Klade ebenfalls Chromid-kodiert die Fähigkeit zur Biofilmbildung zu finden ist. Diesbezüglich wurden alle, zu diesem Zeitpunkt, annotierten extrachromosomalen Elemente von *Roseobacter*-Genomen mittels RAST-Blast verglichen, die eine große Ähnlichkeit zu dem extrachromosomalen Element der Größe 65



Abbildungung 3.2: Genomsequenzannotations-Vergleich von biofilm-assoziierten [LJ10] extrachromosomalen Elementen von Spezies der *Roseobacter*-Klade mittels *RAST-Blast* [ABB+08]; pPgal65: 65 kb großes ECE von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, pLale69: 69 kb großes ECE von *Labrenzia alexandrii* DSM 17067^T, pRden69: 69 kb großes ECE von *Roseobacter denitrificans* DSM 7001^T, pMalg53: 53 kb großes ECE von *Marinovum algicola* DG898, pDshi86: 86 kb großes ECE von *Dinoroseobacter shibae* DSM 16493^T, pRlit83 und pRlit64: 83 kb und 64 kb große ECE von *Roseobacter litoralis* DSM 6996^T

kb von *P. inhibens* DSM 17395 haben. In Abbildung 3.2 ist die Präsenz bzw. Abwesenheit der Exopolysaccharide sowie eines transkriptionellen Aktivators für Biofilme dargestellt.

Jedes der verglichenen *Roseobacter*-Bakterien enthält Sequenzen zur Synthese von Rhamnose. Viele der untersuchten Sequenzen sind auf den Chromiden nachweisbar, alle jedoch, finden sich nur auf dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 wider.

3.1.2 Biofilmassay

Das Biofilmassay kann einen physiologischen Nachweis zur abiotischen biofilm-bildenden Aktivität von Bakterien geben. Die *Roseobacter*-Spezies *P. inhibens* DSM 17395, *Marinovum algicola* DG898, *Marinovum algicola* DSM 10251^T, *Dinoroseobacter shibae* DSM 16493^T, *Roseobacter litoralis* DSM 6996, *Roseobacter denitrificans* DSM 7001^T wurden in Mikrotiterplatten auf ihre Fähigkeit

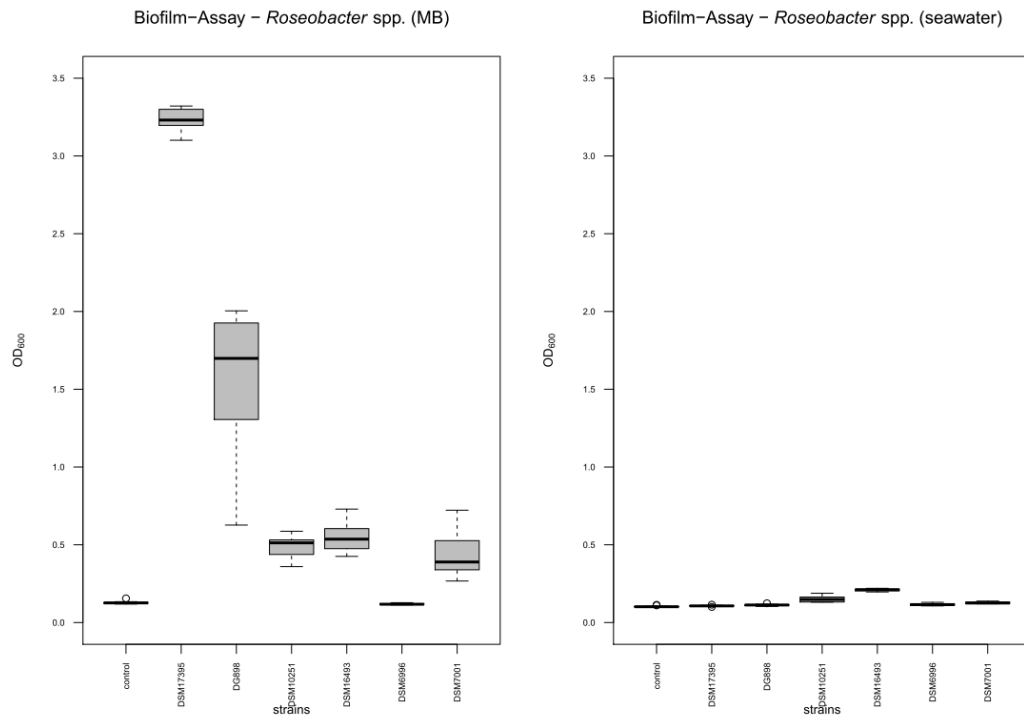


Abbildung 3.3: Boxplot zu den Ergebnissen des Biofilmassays von *P. inhibens* DSM 17395, *Marinovum algicola* DG898, *Marinovum algicola* DSM 10251^T, *Dinoroseobacter shibae* DSM 16493^T, *Roseobacter litoralis* DSM 6996^T, *Roseobacter denitrificans* DSM 7001^T in Marine Broth und Salzwassermedium

zur abiotischen Biofilmbildung hin getestet. Dabei wurde ein Test mit nährstoffreichem Medium (Marine Broth) und ein Test mit nährstoffarmen Medium (einfaches Meerwasser), siehe Abbildung 3.3, durchgeführt.

In nährstoffarmen Medium kann nahezu keine biofilm-bildende Aktivität nachgewiesen werden. Im nährstoffreichen Medium kann für alle Stämme, bis auf *Roseobacter litoralis* DSM 6996^T, eine biofilm-bildende Aktivität nachgewiesen werden. Im Genomsequenzannotations-Vergleich können in *R. litoralis* DSM6996^T alle verglichenen Sequenzen identifiziert werden, bis auf Sequenzen für den Polysaccharidtransport und die Peptidoglykansynthese. Ein weiterer Unterschied zu den biofilm-bildenden Spezies liegt in der Verteilung der untersuchten Sequenzen auf zwei verschiedene extrachromosomale Elemente. In ihrer Intensität stachen besonders die Spezies *P. inhibens* DSM 17395 und *M. algicola* DG898 hervor, ebenfalls dokumentiert in [FGPP15].

P. inhibens DSM 17395 weist jedoch mit Abstand die höchste Biofilmaktivität auf, weshalb auch mit den Chromid-Mutanten ein Biofilm-Assay durch-

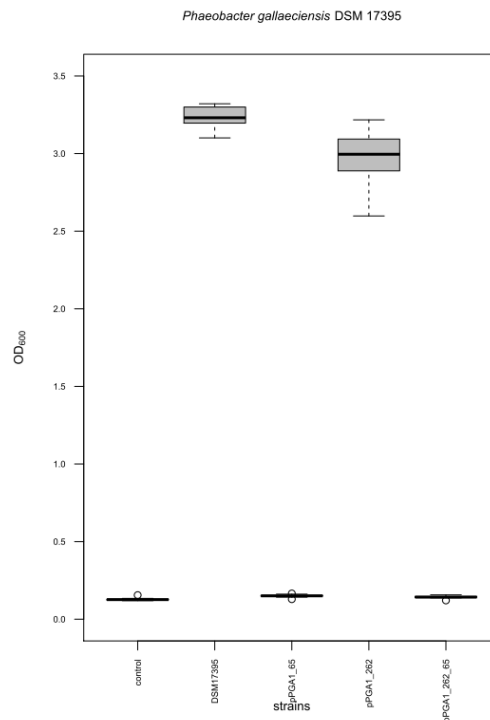


Abbildung 3.4: Boxplot zu den Ergebnissen des Biofilmassays von *P. inhibens* DSM 17395 sowie den Chromid-Mutanten

geführt wurde, um die Bedeutung der extrachromosomalen Elemente für die abiotische Biofilmbildung nicht nur genomisch, sondern auch physiologisch zu überprüfen. Abbildung 3.4 zeigt die Abhängigkeit der Fähigkeit zur abiotischen Biofilmbildung von den Chromiden der Größen 65 kb und 262 kb. Wie die genomische Analyse zeigt, siehe Abbildung 3.1, ist der Anteil an Genomsequenzen, die eine Relevanz für die Biofilmbildung haben, auf dem 65 kb großen Chromid signifikant größer als der Anteil auf dem 262 kb großen Chromid. Dieses Ergebnis spiegelt sich im physiologischen Verhalten wider: ohne das kleinste Chromid ist das Bakterium nicht mehr in der Lage einen abiotischen Biofilm zu produzieren, wohingegen die Mutante ohne das größte Chromid nur eine leicht geringere Intensität der Biofilmbildung zeigt. Wenn dem Bakterium beide Chromide fehlen, lässt sich ebenfalls keine Biofilmbildung mehr nachweisen.

Durch die extrachromosomalen Elemente ist *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 in der Lage einen abiotischen Biofilm zu bilden. Starke Indizien deuten darauf hin, dass dies auch für die Kandidaten *Marinovum algicola* DG898, *Marinovum algicola* DSM 10251^T, *Dinoroseobacter shibae* DSM 16493^T und *Roseobacter denitrificans* DSM 7001^T der *Roseobacter*-Klade gilt.

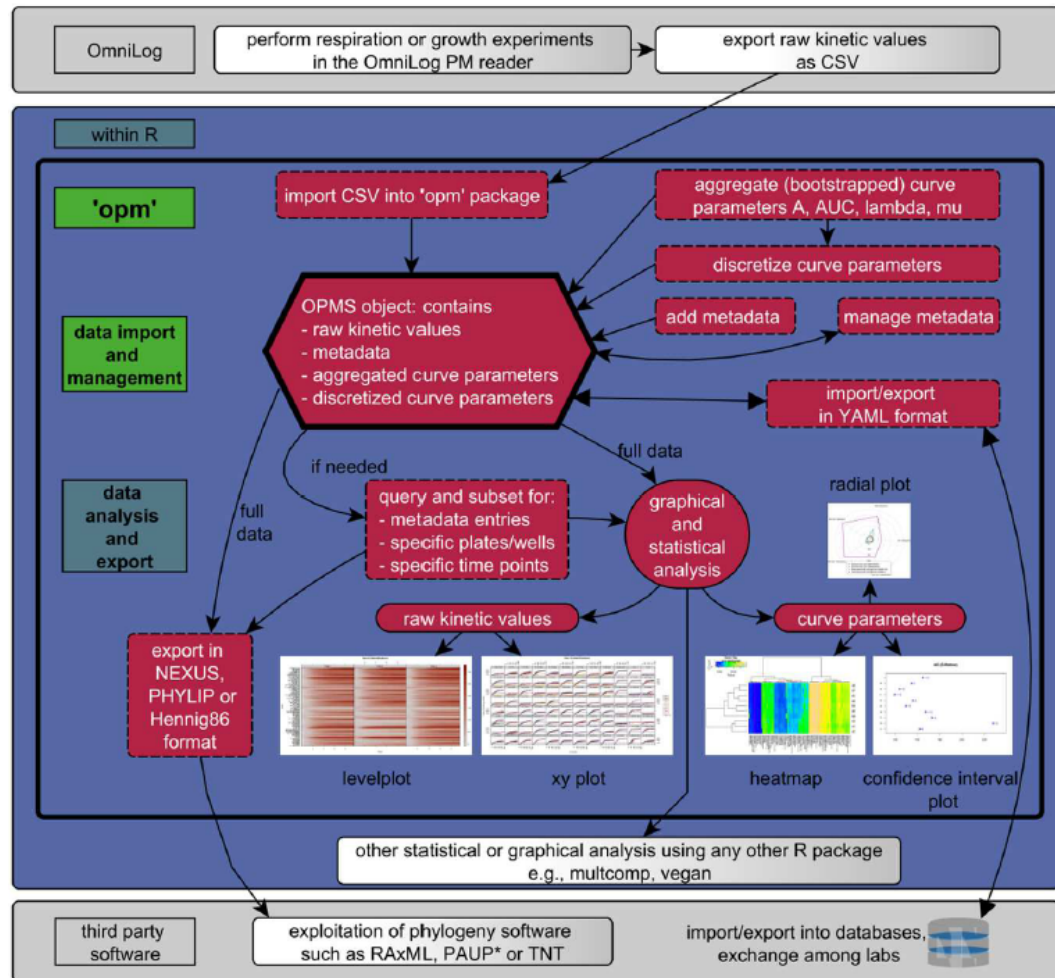


Abbildung 3.5: Genereller Arbeitsfluss des *opm* Pakets sowie der Einbindung in *R* und den Schnittstellen zu Software von Dritten [VSH⁺13]

3.2 R-Paket *opm* zur Analyse von Daten des phänotypischen MicroArrays (PM)

Das *R*-Paket *opm*, als statistische Software zur Auswertung von PM-Daten, ist frei verfügbar (Open-Source) und kann auf dem CRAN-Server heruntergeladen werden. Alle notwendigen und hilfreichen Informationen sind auf folgender Internetseite des *Leibniz-Instituts DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* zur Verfügung gestellt.

<https://www.dsmz.de/research/microorganisms/projects/analysis-of-omni-log-phenotype-microarray-data.html>

3.2.1 Kategorisierung der PM-Substrate

Das PM-System ermöglicht eine Beobachtung der Phänotypen von einzelligen Organismen wie Bakterien, Pilzen oder tierischen Zellkulturen in über 2.000 unterschiedlichen Tests, die in Sätzen von *96-well*-Mikrotiterplatten verteilt sind. Es gibt zwar eine grobe Einteilung der Substrate in Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphat- und Schwefelquellen, biosynthetischen und stickstoffhaltigen Stoffwechselwegen, osmolytischen Konzentrationen, pH-Konzentrationen und konzentrationsabhängigen Chemikaliensensitivitäten [Boc01] [Boc09], jedoch keine detaillierteren Einteilungen in Klassen oder gar Informationen inhaltlicher Art. Deshalb wurden die Substrate der PM-Mikrotiterplatten in dieser Studie in Klassen und Superklassen eingeteilt. Darüber hinaus wurden Informationen zum Inhalt verlinkt. Mittels der Datenbanken MesH, KEGG, Metacyc, CAS und der freien Enzyklopädie wikipedia, wurde jedem Substrat eine Beschreibung oder/und ein *Review*-Artikel zugeordnet, um die Einordnung und Analyse der mannigfaltigen Substrate zu vereinfachen. Im *opm*-Paket sind die Substratinformationen wie folgt implementiert: Die Substratkoordinaten der Eingabedaten können standardisiert in die vollständigen Substratnamen umgewandelt werden, z.B. in der grafischen Auswertung im *XY-Plot*. Um Substrate innerhalb der PM-Platten zu lokalisieren, könnend die Befehle `%types`, `find_substrate` and `find_position` genutzt werden. Die Substratinformationen können mit dem Befehl `%substrate_info` aufgerufen werden, der sowohl CAS-Nummern, als auch KEGG- [KGS⁺14] und Metacyc- [CAB⁺14] Identifikationscodierungen bereit stellt. [VSM⁺12]

3.2.2 Auswertungsmethoden

Das *R*-Paket *opm* bietet zahlreiche, statistisch abgesicherte Möglichkeiten zur Auswertung der PM-Daten, siehe Abbildung 3.5. Mit dem Paket ist es möglich die kinetischen Kurven zu speichern, die Kurvenparameter zu aggregieren, die assoziierten Metadaten der Organismen und experimentellen Bedingungen aufzunehmen, sowie die hochkomplexen Datensätze grafisch und statistisch zu analysieren. Das Paket enthält Plots zu 95%-Konfidenzintervallen, erweiterte *Heatmap*-Grafiken sowie Radialplots und individuelle Möglichkeiten zu der Ermittlung von Durchschnittswerten zum Vergleich der berechneten Kurvenparameter. Zusätzlich ist es möglich die Parameter zu diskretisieren.

3.3 Phänotypisches MicroArray (PM) - Kohlenstoffquellen

3.3.1 Klassifizierung des *P. inhibens* DSM 17395 Wildtyps und der Chromidmutanten

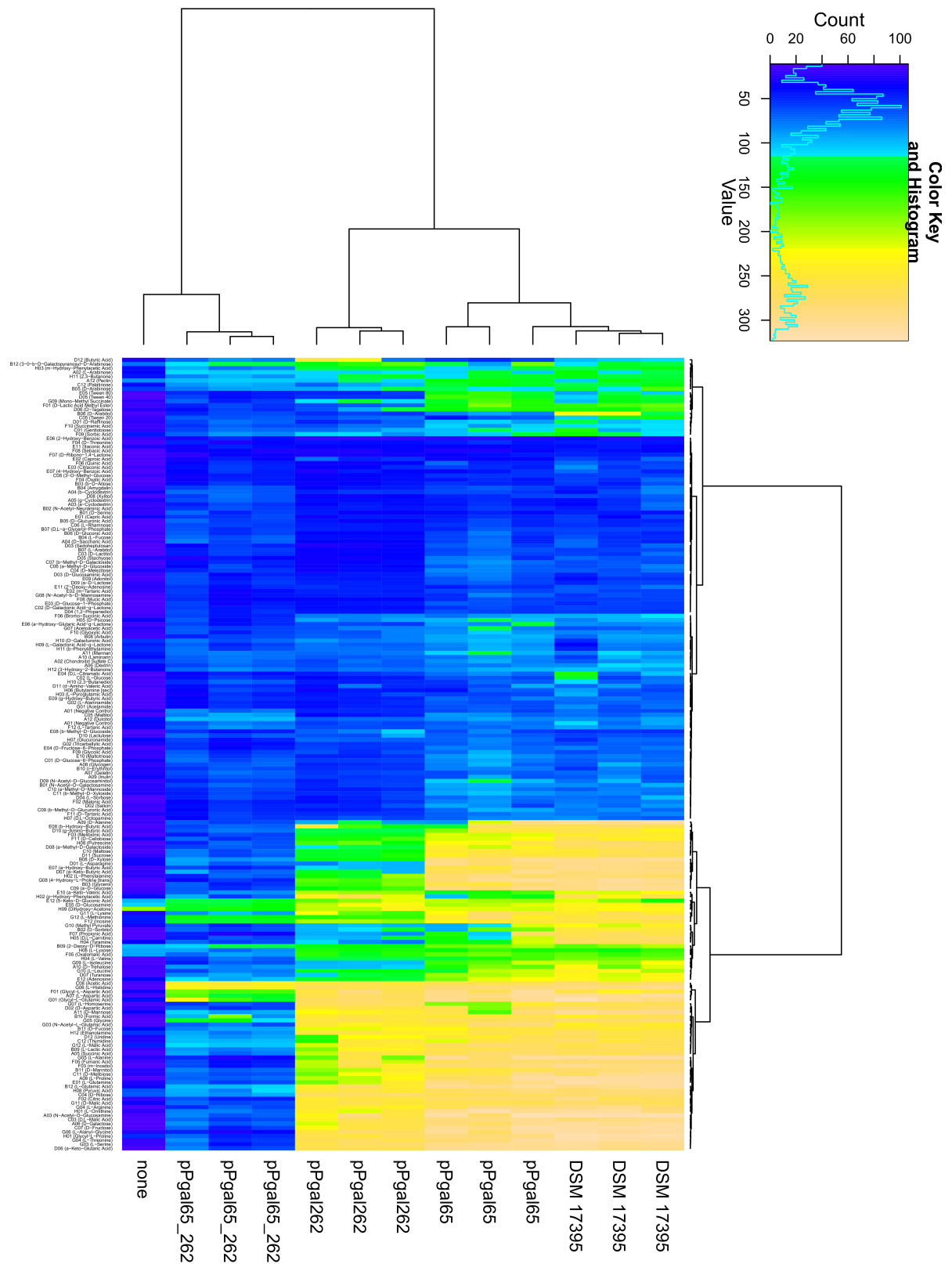
Das phänotypische MicroArray der PM-Platten PM01 und PM02 testet den Phänotyp zu 190 unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.

In dieser Studie wurde *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 Wildtyp und die Chromid-Mutanten ohne das kleine 65 kb-Chromid, ohne das große 262 kb-Chromid, sowie ohne das kleine und das große Chromid untersucht. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Bakterien, nur mit dem Medium, getestet (none). Der Test wurde als dreifaches Replikat durchgeführt. Abbildung 3.6 zeigt, dass zwar keine absolute, jedoch recht gute Reproduzierbarkeit der jeweils drei Replikate, vorliegt. Das Bakterium als Wildtyp ist in der Lage etwa die Hälfte der Kohlenstoffquellen zu nutzen. Dies gilt ebenfalls für die Mutante *pPinh65*. Deutlich geringere Werte zeigen die Ergebnisse der Mutante *pPinh262*. Die Mutante ohne das große und das kleine Chromid *pPinh65_262* hingegen, zeigt einen Phänotyp, der nur noch eine sehr geringe Anzahl an Kohlenstoffquellen nutzen kann. Folglich ist für die Nutzung von Kohlenstoffquellen auch die Kombination aus beiden Chromiden bedeutsam. Zusätzlich werden die Ergebnisse mit abnehmender genetischer Information des Bakteriums schwächer. Der Wildtyp mit drei Chromiden erzielt die höchsten Werte. Die Mutante ohne das große und das kleine Chromid erzielt die niedrigsten Werte.

Die Ergebnisse der Klassifizierung des Wildtyps und der drei Chromid-Mutanten mittels COG-Kategorien, siehe Abbildung 3.1, ließen durch die hohen Werte in der Kategorie *M*, bereits auf PM01- und PM02-Ergebnisse dieser Art schließen.

3.3.2 Diskriminanzanalyse

Die Diskriminanzanalyse, siehe Abbildung 2.1, ermöglicht eine Datenreduktion der PM-Ergebnisse. Dadurch wiederum, ist eine inhaltliche Interpretation des phänotypischen MicroArrays möglich. Dabei wurde in dieser Studie auf dem Genom nach dem Substrat möglichen zugehörigen Kernenzymen mit *Locus*



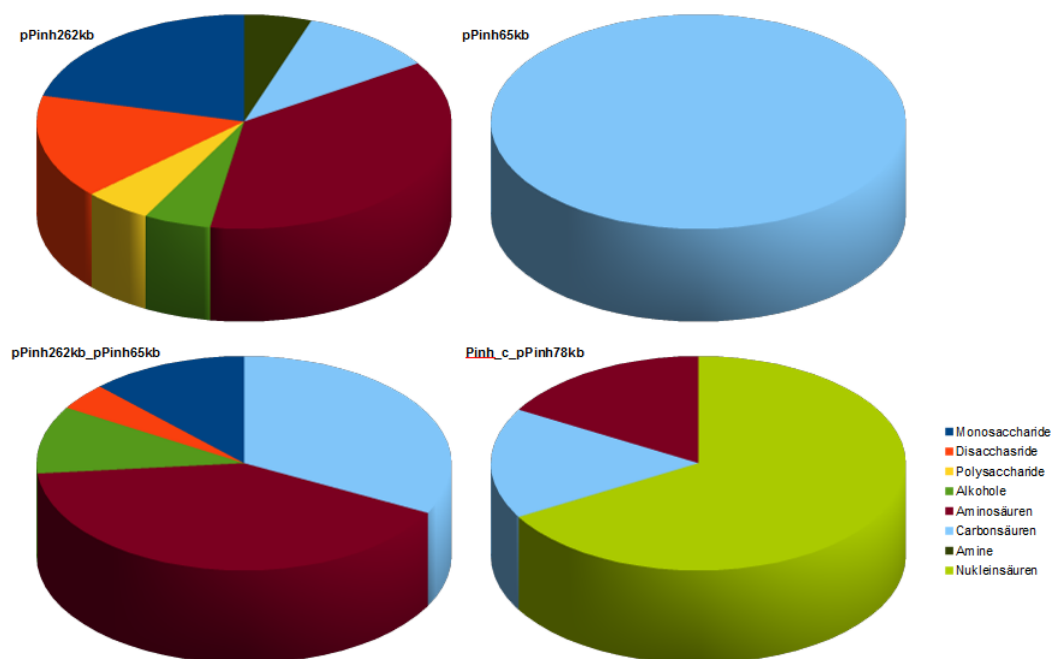


Abbildung 3.7: Kreisdiagramme mit absoluten positiven Reaktionen zur Einordnung der Substratklassen der Mono-, Di- und Polysaccharide, Alkohole, Amino- und Carbonsäuren, Amine und Nukleinsäuren, die durch die genetische Information der verschiedenen Kompartimente von *P. inhibens* DSM 17395 entstehen; links oben pPinh262kb, rechts oben pPinh65kb, links unten pPinh262kb-pPinh65kb, rechts unten Pinh-c-pPinh78kb.

Tags und der COG-Kategorie gesucht.

Die Übersichtsgrafik Abbildung 3.7 zeigt die zwölf Klassen plus unklassifizierte Chemikalien, in die die Kohlenstoffquellen der PM-Platten PM01 und PM02 aufgeteilt werden können, die eine positive Reaktion für *P. inhibens* DSM 17395 und/oder einer der Chromid-Mutanten gezeigt haben. Insgesamt waren 77 positive Reaktionen zu verzeichnen. Dabei machen die Mono-, Di- und Polysaccharide einen Gesamtanteil von 16 positiven Reaktionen aus. Die Carbonsäuren haben einen Gesamtanteil von 21 positiven Reaktionen, die Aminosäuren von 28 positiven Reaktionen, die Alkohole von 6 positiven Reaktionen, die Nukleinsäuren von 4 positiven Reaktionen und die Amine von 1 positiver Reaktion. Zusätzlich gab es 1 positive Sonderreaktion, die nicht in der Grafik aufgeführt ist. Auf dem größten 262 kb-Chromid liegt der relevante genetische Code für positive Reaktionen in sieben unterschiedlichen Substratklassen, wohingegen auf dem kleinen 65 k- Chromid nur relevanter genetischer Code für eine positive Reaktion der Substratklasse der Carbonsäuren liegt.

Auf dem größten 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinsten 65 kb-Chromid liegt der relevante genetische Code für positive Reaktionen in fünf unterschiedlichen Substratklassen. Auf beiden Chromiden und in Kombination liegt der genetische Code für Carbonsäuren. In Kombination kommen noch Mono- und Disaccharide sowie Aminosäuren hinzu. Das Chromosom bzw. 78 kb-Chromid enthalten den genetischen Code für die Nukleinsäuren, sowie eine getestete Aminosäure und eine Carbonsäure.

Die Bedeutung des 262 kb großen Chromids für den Phänotyp

Die Diskriminanzanalyse über den Wildtyp und die drei Chromid-Mutanten lässt durch die Kombination 2,0/1,2,0/1, siehe Abbildung 2.1, einen Rückschluss darauf zu, dass der relevante genetische Code für den Phänotyp auf dem 262 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 liegt. Für sechs der positiv getesteten Substrate konnten auf dem 262 kb großen Chromid Kernenzyme identifiziert werden, siehe Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2. Der genetische Code des 262 kb großen Chromids ist besonders für Saccharide (acht positive Ergebnisse) und Aminosäuren (vier positive Ergebnisse) relevant. Die Ergebnisse zu der Homologie in biologisch sinnvolle Klassen von Genen (COG), Abbildung 3.1 und dazugehörig Tabelle 3.1, ergibt dazu passend die Kategorien *M* Zellwand-/ Membran-/ Hüllenbiogenese, *E* Aminosäurenmetabolismus und -transport sowie *K* Transkription, als bedeutsam für das große Chromid aus.

Die Bedeutung des 65 kb großen Chromids für den Phänotyp

Die Diskriminanzanalyse über den Wildtyp und die drei Chromid-Mutanten lässt durch die Kombination 2,2,0/1,0/1 siehe Abbildung 2.1, einen Rückschluss darauf zu, dass der relevante genetische Code für den Phänotyp ausschließlich auf dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 liegt. Diese Ergebniskombination liegt für eins der positiv getesteten Substrate vor. Es handelt sich dabei um die Carbonsäure *p-Hydroxyphenylelessigsäure*. Da auf dem kleinen Chromid die COG-Kategorie *M* signifikant hervorsticht, wäre eine höhere Anzahl an positiven Reaktionen für die Klassen der Saccharide zu erwarten gewesen. Da jedoch auch die COG-Kategorie *T* Signaltransduktion bedeutend für das Chromid ist, lässt dies auf eine regulatorische Bedeutung des genetischen Codes des kleinsten Chromids schließen.

Die Bedeutung des 262 kb- in Kombination mit dem 65 kb großen Chromids für den Phänotyp

Die Diskriminanzanalyse über den Wildtyp und die drei Chromid-Mutanten lässt durch die Kombinationsmöglichkeiten

2,0/1,2,2

2,2,0/1,2

2,2,2,0/1 oder

2,0/1,0/1,0/1

siehe Abbildung 2.1, einen Rückschluss darauf zu, dass der relevante genetische Code für den Phänotyp auf dem 262 kb großen Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 liegt. Für 27 der positiv getesteten Substrate konnten auf dem 262 kb und gegebenenfalls 65 kb großen Chromid mögliche Kernenzyme identifiziert werden, siehe Tabelle 4.4, Tabelle 4.5, Tabelle 4.6, Tabelle 4.7, Tabelle 4.8, Tabelle 4.9 und Tabelle 4.10. Besonders die Klasse der Aminosäuren mit 21 positiven Reaktionen und die Klasse der Carbonsäuren mit 16 positiven Reaktionen stechen hervor, siehe auch Abbildung 3.7. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Ergebnissen der COG-Analyse in den Kategorien *E* Aminosäurenmetabolismus und -transport, *M* Zellwand-/ Membran-/ Hüllenbiogenese und *T* Signaltransduktion wider.

Die Bedeutung des Chromosoms oder des 78 kb großen Chromids für den Phänotyp

Die Diskriminanzanalyse über den Wildtyp und die drei Chromid-Mutanten lässt durch die Kombination 2,2,2,2, siehe Abbildung 2.1, einen Rückschluss darauf zu, dass der relevante genetische Code für den Phänotyp auf dem Chromosom oder dem mittlerern 78 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 liegt. Diese Ergebniskombination liegt bei einer Aminosäure *L-Histidin*, die Carbonsäure *Essigsäure* und vier Nukleinsäuren *Thymidin*, *Adenosin*, *Inosin* und *Uridin* vor. Die Ergebnisse der COG-Analyse stützen die PM-Ergebnisse mit den COG-Kategorien *E* Aminosäurenmetabolismus und -transport (c, 78), *G* Kohlenhydratmetabolismus und -transport (78), sowie *K* Transkription (78).

Sonderreaktionen

Die Definition einer *Sonderreaktion* ist eine stärkere positive Reaktion der Mutanten als des Wildtyps. Ohne das jeweilige Chromid, vergleiche die Kombinationsmöglichkeiten Abbildung 2.1, reagiert das Bakterium folglich stärker. Dieser Fall tritt bei den Kohlenstoffquellen nur einmal bei der Carbonsäure *Buttersäure* auf. Für dieses Substrat ist eine absolut positive Reaktion nur bei der Mutante ohne das 262 kb-Chromid zu detektieren. Ausschließlich ohne das 262 kb-Chromid wird *Buttersäure* als Kohlenstoffquelle verwendet.

3.4 Phänotypisches MicroArray (PM) - Chemikaliertoleranz

Das phänotypische MicroArray der PM-Platten PM10 bis PM20 testet den Phänotyp zu 240 Chemikalien. Einen großen Anteil der getesteten Chemikalien stellt die Gruppe der Antibiotika dar. Um die vielen unterschiedlichen Antibiotikasubstrate besser einordnen zu können, wurden sie klassifiziert und beschrieben, siehe Tabelle 3.3, Tabelle 3.4, Tabelle 3.6.

3.4.1 Diskriminanzanalyse

Die Diskriminanzanalyse, siehe Abbildung 2.1, der PM-Platten PM10-PM20 zeigt den Phänotyp von *P. inhibens* DSM 17395 und der Chromid-Mutanten in Bezug auf die Chemikaliertoleranz. Das Bakterium hat bei dem Test eine minimale C-Quelle zur Verfügung und wird auf seine Toleranz gegenüber des vorgelegten meist giftigen Substrats hin untersucht. Alle positiven Ergebnisse sind im folgenden dargestellt. Die Chemikalien sind in Klassen und Superklassen eingeteilt und nach Möglichkeit inhaltlich beschrieben. Außerdem wurde das Genom des großen 262 kb- und des kleinen 65 kb-Chromids nach möglichen Kernenzymen für die Toleranzen untersucht.

Übersicht

In dieser Studie wurde *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 Wildtyp und die Chromid-Mutanten ohne das kleine 65 kb-Chromid, ohne das große 262 kb-Chromid, sowie ohne das kleine und das große Chromid für die Chemikaliertoleranzen als zweifache Replikate untersucht. Dabei konnte sowohl für den

Tabelle 3.2: Antibiotikaklassen, die im phänotypischen MicroArray verwendet werden; (WM = Wirkungsmechanismus).

Klasse	Klasse des WM	Beschreibung des Wirkungsmechanismus (WM)	Review
Aminocumarine	Hemmung der Transkription und/oder DNA-Replikation	Aminocumarine sind eine Antibiotikaklasse, die ihre Wirkung über die Hemmung der DNA-Gyraseenzyme, die in die Zellteilung von Bakterien involviert sind, entfalten. Sie sind von <i>Streptomyces</i> -Spezies abgeleitet.	[Hei09]
Aminoglykoside	Hemmung der Protein-synthese	Aminoglykoside binden die bakterielle 30S ribosomale Untereinheit, teilweise auch die 50S-Untereinheit, und hemmen die Translokation der peptidyl-tRNA von der A-Seite zur P-Seite. Zusätzlich kommt es zur Fehlübersetzungen der mRNA, so dass das Bakterium nicht mehr in der Lage ist überlebenswichtige Proteine zu synthetisieren.	[Whe84]
Ansamycine		Ansamycine sind eine Familie mit sekundären Metaboliten, die antimikrobielle Aktivität gegenüber vielen Gram-positiven und manchen Gram-negativen Bakterien zeigen. Sie beinhalten verschiedene Substanzen, z.B.: <i>Streptovaricin</i> und <i>Rifamycin</i> . Zusätzlich zeigen diese Substanzen antivirale Aktivität gegenüber Bakteriophagen und dem Pockenvirus.	[WS71]

Tabelle 3.3: Fortsetzung. Antibiotikaklassen, die im phänotypischen MicroArray verwendet werden; (WM = Wirkungsmechanismus).

Klasse	Klasse des WM	Beschreibung des Wirkungsmechanismus	Review
Chinolone	Hemmung der Transkription und/oder DNA-Replikation	Hemmen die bakterielle DNA-Gyrase oder Topoisomerase-IV-Enzyme und dadurch die DNA-Replikation und Transkription.	[And05]
Chloramphenicol und Analoga	Hemmung der Proteinsynthese	Hemmen bakterielle Proteinsynthese durch eine Bindung der 50S-Untereinheit der Ribosomen.	[Bal04]
Fosfomycine	Hemmung der Zellwandsynthese	Inaktivieren Enolpyruvyltransferase durch eine Blockierung der Zellwandsynthese.	[Raz12]
Glykopeptide	Hemmung der Zellwandsynthese	Hemmung der Peptidoglykansynthese.	[PY06]
Lincosamide	Hemmung der Proteinsynthese	Binden die 50S-Untereinheit der bakteriellen ribosomalen RNA und hemmen somit die Proteinsynthese.	[RSS07]
Lipopeptide	Zerstörung der Zellmembranfunktion	Binden an die Membran und bewirken somit eine rasante Depolarisierung, die zu einem Abfall des Membranpotentials führt, das zu einer Hemmung der Protein-, DNA- und RNA-Synthese führt.	[PGN ⁺ 09]

Tabelle 3.4: Fortsetzung I. Antibiotikaklassen, die im phänotypischen MicroArray verwendet werden; (WM = Wirkungsmechanismus).

Klasse	Klasse des WM	Beschreibung des Wirkungsmechanismus	Review
Makrolide	Hemmung der Prote- insynthese	Hemmung der bakteriellen Prote- insynthese durch eine reversible Bindung der 50S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen durch ei- ne Hemmung der Translokation von peptidyl-tRNA.	[Dav11]
Metronidazole	unspezifisch	Produzieren toxische freie Radika- le, die DNA und Proteine zerstö- ren. Dieser unspezifische Mechanis- mus ist verantwortlich für die Ak- tivität gegenüber einer Vielzahl von Bakterien, Amöben und Protozoen.	[OS83]
Nitroimidazole	Hemmung der DNA- Synthese	Intramikrobiell, wobei erst durch Reduktion der Nitro-Gruppe die hochwirksamen Metaboliten entste- hen, welche intrazellulär die bakteri- elle DNA schädigen.	[Edw80]
Nitrofurans	Hemmung der DNA- Synthese		[VHF08]
Polypeptide	Hemmung der Zell- wandsyn- these	Hemmen Isoprenyl-Pyrophosphat, ein Molekül das Bausteine von außen nach innen durch die Pepti- doglykanschicht transportiert.	[BB11]

Tabelle 3.5: Fortsetzung II. Antibiotikaklassen, die im phänotypischen MicroArray verwendet werden; (WM = Wirkungsmechanismus).

Klasse	Klasse des WM	Beschreibung des Wirkungsmechanismus	Review
Sulfonamide	Hemmung der Folsäuresynthese	Aktiv in der Folsäuresynthese als Hemmer des Enzyms Dihydropteroat-Synthetase (DHPS). DHPS katalysiert die Umsetzung von PABA (para-Aminobenzoat) zu Dihydropteroat, eine Kernreaktion in der Folsäuresynthese. Folsäure ist essentiell für die Zelle in der DNA-Synthese.	[Hen43]
Tetrazykline	Hemmung der Proteinsynthese	Hemmen die Bindung aminoacyl-tRNA an den mRNA-ribosomalen Komplex, hauptsächlich durch eine Bindung an die 30S ribosomale Untereinheit im mRNA Translationskomplex.	[NL11]
Thioamide	Hemmung der Zellwandsynthese	Bilden kovalente Addukte mit Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide (NAD). Diese Addukte inhibieren <i>M. tuberculosis</i> and <i>M. leprae InhA</i> .	[WLG ⁺ 07]

Tabelle 3.6: Antibiotikaklassen des phänotypischen MicroArrays der Superklasse *B-Lactame* mit der Klasse des Wirkungsmechanismus *Hemmung der Zellwandsynthese* und der Beschreibung des Wirkungsmechanismus *Unterbrechung der Synthese der Peptidoglykanschicht der bakteriellen Zellwand*.

Klasse	Review
B-Lactame – Carbacepheme	[Cop92]
B-Lactame – Carbapeneme	[PWETB11]
B-Lactame – Cephalosporine (Erste Generation)	[Fry81]
B-Lactame – Cephalosporine (Zweite Generation)	[Fry81]
B-Lactame – Cephalosporine (Dritte Generation)	[ESSMR07]
B-Lactame – Cephalosporine (Vierte Generation)	[Gia99]
B-Lactame – Cephalosporine (Fünfte Generation)	[BMK11]
B-Lactame – Monobactame	[BH91]
B-Lactame – Penicilline	[KD11]

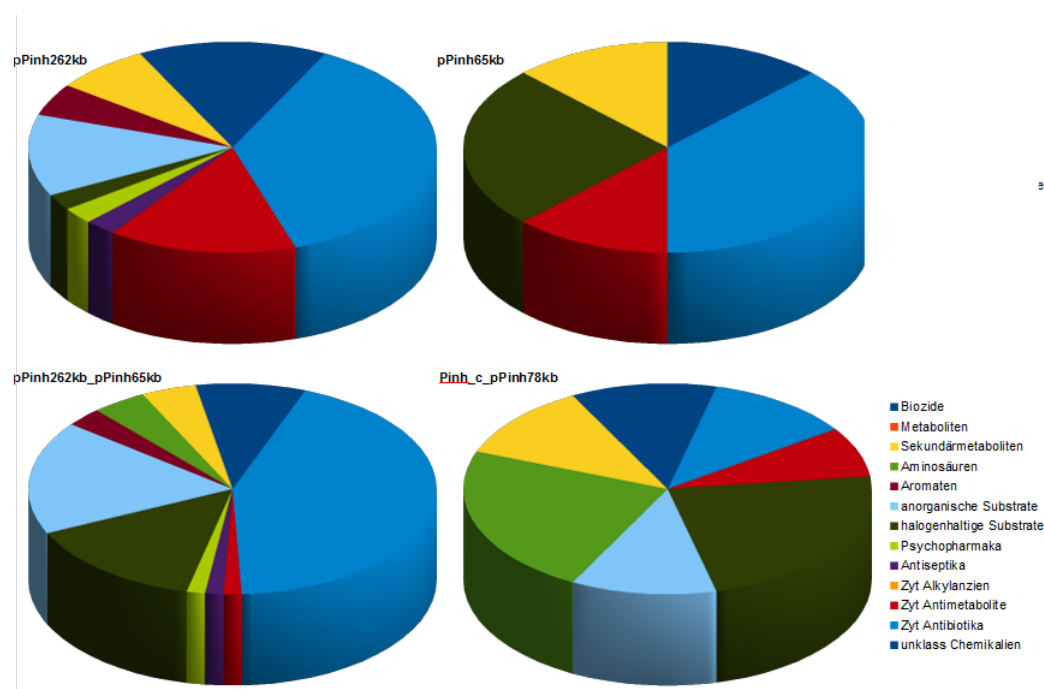


Abbildung 3.8: Kreisdiagramme mit absoluten positiven Reaktionen zur Einordnung der Klassen der Biozide, Metaboliten, Sekundärmetaboliten, Aminosäuren, Aromaten, anorganischen Substrate, halogenhaltigen Substrate, Psychopharmaka, Antiseptika, Zytostatika – Alkylanzien, Zytostatika – Antimetabolite, Zytostatika – Antibiotika und unklassifizierten Chemikalien, die durch die genetische Information der verschiedenen Kompartimente von *P. inhibens* DSM 17395 toleriert werden; links oben pPinh262kb, rechts oben pPinh65kb, links unten pPinh262kb_pPinh65kb, rechts unten Pinh_c_pPinh78kb.

Wildtyp als auch für die Mutanten ein optimaler pH-Bereich von 7-10 detektiert werden (Platte PM10).

In Abbildung 3.8 sind die 164 absolut positiv getesteten Reaktionen der Platten PM10-20 als Kreisdiagramme sortiert nach Klassen dargestellt, ausgenommen der Sonderreaktionen. Der relevante genetische Code für die unterschiedlichsten Toleranzen (sieben verschiedene Klassen) liegt auf dem Chromosom bzw. 78kb großen Chromid. Auf dem größten 262 kb-Chromid liegt die genetische Information von neun verschiedenen Chemikalienklassen. Auf dem größten in Kombination mit dem kleinsten 65 kb-Chromid liegt der relevante genetische Code für zehn unterschiedliche Chemikalienklassen. Die genetische Information des kleinsten Chromids beinhaltet die Information für Toleranzen von fünf unterschiedlichen Chemikalienklassen.

In Abbildung 3.9 sind die absolut positiv getesteten Reaktionen der Platten

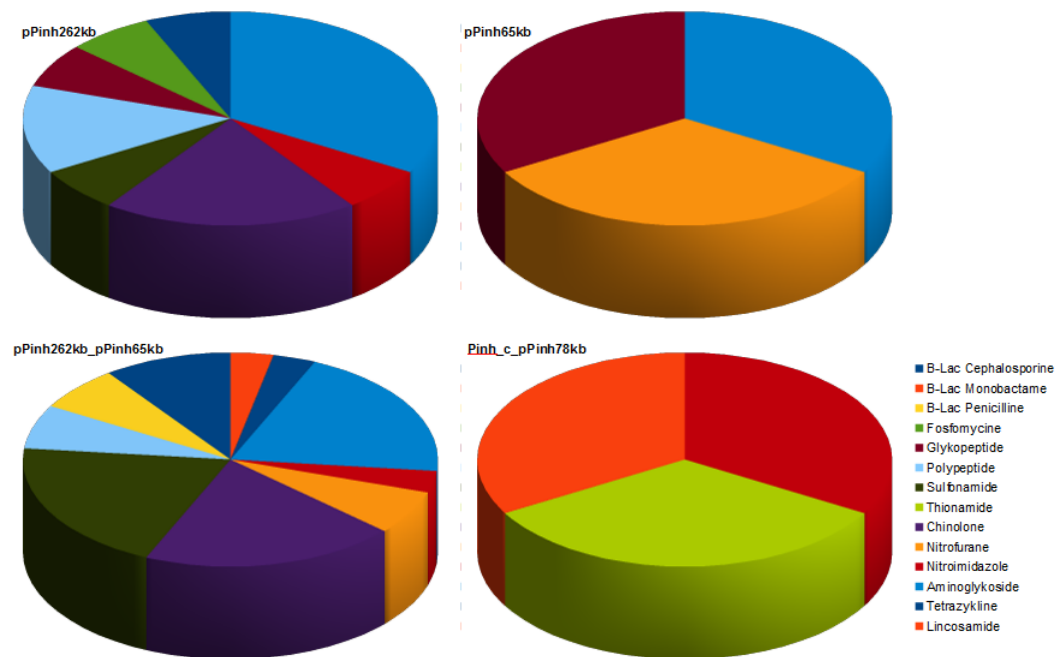


Abbildung 3.9: Kreisdiagramme mit absoluten positiven Reaktionen zur Einordnung der Zytostatika – Antibiotikatoleranzen der Klassen B-Lactame – Cephalosporine, B-Lactam – Monobactame, B-Lactame – Penicilline, Fosfomycine, Glykopeptide, Polypeptide, Sulfonamide, Thionamide, Chinolone, Nitrofurane, Nitroimidazole, Aminoglykoside, Tetrazykline und Lincosamide, die durch die genetische Information der verschiedenen Kompartimente von *P. inhibens* DSM 17395 toleriert werden; links oben pPinh262kb, rechts oben pPinh65kb, links unten pPinh262kb_pPinh65kb, rechts unten Pinh_c_pPinh78kb.

PM10-20 als Kreisdiagramme sortiert nach 14 Zytostatika – Antibiotikaklassen dargestellt. Die größte Variabilität der Resistenz gegenüber den untersuchten Antibiotikaklassen kodiert auf dem größten 262 kb-Chromid (acht Antibiotikaklassen), nur übertroffen von dem großen 262 kb- in Kombination mit dem kleinen 65 kb-Chromid (zehn Antibiotikaklassen). Der relevante genetische Code für jeweils drei unterschiedliche Antibiotikaklassen liegt auf dem Chromosom bzw. 78 kb-Chromid und auf dem kleinsten 65 kb-Chromid.

3.4.2 Kernenzyme für Chemikaliertoleranzen - Chromid 65 kb und Chromid 262 kb

In der folgenden Tabelle 5.1, Tabelle 5.2, Tabelle 5.3, Tabelle 5.4, Tabelle 5.5 und in der Fortsetzung Tabelle 5.6 sind mögliche relevante Kernenzyme und zugehörige Stoffwechselwege bzw. Reaktionen der Chromide 65 kb und 262 kb von *P. inhibens* DSM 17395 für die Toleranzen gegenüber der getesteten Chemikalien gelistet. Die Kernenzyme, die eine Relevanz für die Chemikaliertoleranzen haben könnten, gehören der COG-Kategorien *E* Aminosäurenmetabolismus und -transport, *K* Transkription, *P* Anorganischer Ionentransport und -metabolismus, *Q* Sekundärstrukturen, *R* generelle funktionelle Aussage möglich und *V* Abwehrmechanismen an.

Die Bedeutung des 262 kb großen Chromids für den Phänotyp

Die Diskriminanzanalyse über den Wildtyp und die drei Chromid-Mutanten lässt durch die Kombination 2,0/1,2,0/1, siehe Abbildung 2.1, einen Rückschluss darauf zu, dass der relevante genetische Code oder regulatorische Informationen für den Phänotyp auf dem 262 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 liegen. Gegen die in Tabelle 5.7, Tabelle 5.8, Tabelle 5.9, Tabelle 5.10, Tabelle 5.11, Tabelle 5.12 und Tabelle 5.13 gelisteten Substrate der Klassen der Biozide, Sekundärmetabolite, Aromaten, anorganischen und halogenhaltigen Substrate, Psychopharmaka, Antiseptika, Zytostatika – Antimetaboliten, Zytostatika – Antibiotika (Cephalosporine, Fosfomycin, Glykopeptide, Polypeptide, Sulfonamide, Chinolone, Nitroimidazole und Aminoglykoside) und drei unklassifizierten Chemikalien ist das Bakterium durch die genetischen Informationen auf Chromid 262 kb tolerant.

Die Bedeutung des 65 kb großen Chromids für den Phänotyp

Die Diskriminanzanalyse über den Wildtyp und die drei Chromid-Mutanten lässt durch die Kombination 2,2,0/1,0/1, siehe Abbildung 2.1, einen Rückschluss darauf zu, dass der relevante genetische Code oder regulatorische Informationen für den Phänotyp auf dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 liegen. Gegen die in Tabelle 5.14 und Tabelle 5.15 gelisteten Substrate der Klassen der Sekundärmetaboliten, halogenhaltigen Substrate, Zytostatika – Antimetaboliten, Zytostatika – Antibiotika (Glykopeptide, Nitrofurane und Aminoglykoside) sowie unklassifizierten Chemikalien ist das Bakterium durch die genetischen Informationen auf Chromid 65 kb tolerant.

Die Bedeutung des 262 kb in Kombination mit dem 65 kb großen Chromids für den Phänotyp

Die Diskriminanzanalyse über den Wildtyp und die drei Chromid-Mutanten lässt durch die Kombinationsmöglichkeiten

2,0/1,2,2

2,2,0/1,2

2,2,2,0/1 oder

2,0/1,0/1,0/1

siehe Abbildung 2.1, einen Rückschluss darauf zu, dass der relevante genetische Code oder regulatorische Informationen für den Phänotyp auf dem 262 kb großen Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 liegen. Gegen die in Tabelle 5.16, Tabelle 5.17, Tabelle 5.19, Tabelle 5.20, Tabelle 5.21, Tabelle 5.22, Tabelle 5.23, Tabelle 5.24 und Tabelle 5.25 gelisteten Substrate der Klassen der Biozide, Sekundärmetaboliten, Aminosäuren, Aromaten, anorganischen und halogenhaltigen Substrate, Psychopharmaka, Antiseptika, Zytostatika – Antimetaboliten, Zytostatika – Antibiotika (Cephalosporine, Penicilline, Polypeptide, Sulfonamide, Chinolone, Nitrofurane, Nitroimidazole, Aminoglykoside, Tetrazykline, Lincosamide) sowie unklassifizierten Chemikalien ist das Bakterium durch die genetischen Informationen auf Chromid 65 kb tolerant. Der genetische Code des größten und kleinsten Chromids in Kombination ergibt die umfangreichsten Chemikaliertoleranzen.

Die Bedeutung des Chromosoms oder des 78 kb großen Chromids für den Phänotyp

Die Diskriminanzanalyse über den Wildtyp und die drei Chromid-Mutanten lässt durch die Kombination 2,2,2,2, siehe Abbildung 2.1, einen Rückschluss darauf zu, dass der relevante genetische Code oder regulatorische Informationen für den Phänotyp auf dem Chromosom und/ oder 78 kb großen Chromid von *P. ihbens* DSM 17395 liegen. Gegen die in Tabelle 5.26, Tabelle 5.27, Tabelle 5.28 und Tabelle 5.29 gelisteten Substrate der Klassen der Biozide, Sekundärmetaboliten, Aminosäuren, anorganische und halogenhaltige Substrate, Zytostatika – Antimetabolite, Zytostatika – Antibiotika (Monobactame, Thionamide, Nitroimidazole) und weitere unklassifizierte Chemikalien ist das Bakterium durch die genetischen Informationen auf dem Chromosom und/ oder dem 78 kb großen Chromid tolerant.

Sonderreaktionen

Die Definition einer *Sonderreaktion* ist eine stärkere positive Reaktion der Mutanten als des Wildtyps. Ohne das jeweilige Chromid, vergleiche die Kombinationsmöglichkeiten, Abbildung 2.1

0/1,0/1,2,0/1 Rkt. bei Mutante ohne pPinh65

0/1,2,2,0/1 Rkt. bei Mutanten ohne pPinh262 und pPinh65

0/1,0/1,2,2 Rkt. bei Mutante ohne pPinh65 und bei Doppelmutante ohne pPinh262_pPinh65

reagiert das Bakterium resistenter, siehe Tabelle 5.30, Tabelle 5.31 und Tabelle 5.32. Die Chromidmutante ohne das kleine 65 kb-Chromid hat positive Reaktionen bei der Aminosäure *Poly-L-Lysin*, dem Sekundärmetabolit *Cumarin*, dem anorg. Stoff *Lithiumchlorid*, dem Halogen *Chlorhexidin*, dem Zytostatika – Alkylanz *Chlorambucil*, dem Zytostatika – Antimetabolit *Trifluridin*, das Fungizid *Blasticidin S*, den Zytostatika – Antibiotika – Cephalosporin *Cefoperazon*, *Cefamandole*, dem Zytostatika – Antibiotika – Sulfonamid *Sulfamonomethoxin*, dem Psychopharmakon – Antipsychotikum *Chlorpromazin*, den unklassifizierten Chemikalien *Compound 48/80* und *Sulfachloropyridazin*. Die Chromidmutante ohne das große 262 kb-Chromid und ohne das kleine 65 kb-Chromid hat positive Reaktionen bei dem Sekundärmetabolit *Harnane*, dem Biozid *Triclosan* und *Oxycarboxin*, dem Metabolit *Pyrophosphat*, dem anorganische Substraten *Phenylarsinoxid* und *Hydroxylamin* sowie dem halo-

genhaltigen Substrat *Floxuridine*. Die Chromidmutante ohne das große 262 kb-Chromid und kleine 65 kb-Chromid in Kombination, sowie bei der Chromidmutante ohne das kleine 65 kb-Chromid hat eine positive Reaktionen bei dem Metabolit *D,L-a-Liponsäure*.

Die Tabellen enthalten zusätzlich Beschreibungen der Substrate bzw. Chemikalien, die automatisiert aus den Datenbanken *wikipedia*, *MeSH*, *CAS*, *MetaCyc* gezogen werden konnten.

Kapitel 4

Ergebnistabellen zu phänotypischem MicroArray (PM) - Kohlenstoffquellen

In diesem Kapitel sind die positiv getesteten Substrate der PM-Platten PM01 und PM02 in tabellarischer Form gelistet und sortiert nach Genkompartimenten von *P. inhibens* DSM 17395 laut Diskriminanzanalyse, siehe Abbildung 2.1. Zusätzlich sind zu jedem Substrat inhaltliche Informationen aus den oben genannten Datenbanken, siehe 2.11, in der jeweils generierten Sprache in Form der zugehörigen Klassen und möglichen Kernenzyme, *Locus-Tags* und COG-Kategorien der Chromide der Größe 262 kb und 65 kb von *P. inhibens* DSM 17395 gesammelt und gelistet.

Tabelle 4.1: Das 262 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Mono-, Di- und Polysaccharide, sowie Alkohole durch zugehörige Kernenzyme

Klasse	Substrat	Kernenzym	Locus Tag	COG
Monosaccharide	D-Xylose	D-xylose-binding periplasmic protein (xyIF)	PGA1_262p00430	G
		xylose transport system permease protein (xyIH)	PGA1_262p00440	
		sugar abc transporter, atp-binding protein (3.6.3.17) (xyIG)	PGA1_262p00450	
Monosaccharide	a-D-Glucose	aldose 1-epimerase (5.1.3.3)	PGA1_262p00390	G
		alcohol dehydrogenase (AlkI)	PGA1_262p00210	G
Monosaccharide	Turanose			
Monosaccharide	a-Methyl-D-Galactosid			
Disaccharide	D-Maltose			
Disaccharide	Saccharose			
Disaccharide	Melibionsäure			
Disaccharide	D-Cellobiose	putative glycosyl transferase [EC:2.4.-.-]_exoO	PGA1_262p00050	M
		putative glycosyl transferase [EC:2.4.-.-]_exoO	PGA1_262p00060	
Alkohole	Glycerin			

Tabelle 4.2: Das 262 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Aminosäuren oder ihre Derivate, sowie Carbonsäuren und Amine durch zugehörige Kernenzyme

Klasse	Substrat	Kernenzym	Locus Tag	COG
Aminosäuren	L-Asparagin			
Aminosäuren	L-Valin			
Aminosäuren	L-Leucin			
Aminosäuren	g-Amino-Buttersäure	succinate-semialdehyde dehydrogenase GabD	PGA1_262p00540	C
Aminosäuren	D,L-Carnitin	putative enoyl-CoA hydratase / isomerase ATP-dependent AMP binding enzyme putative enoyl-CoA hydratase putative enoyl-CoA hydratase BCCIT transporter	PGA1_262p01540 PGA1_262p01840 PGA1_262p01850 PGA1_262p01980 PGA1_262p01440	I M
Aminosäuren	L-Methionin			
Aminosäuren	L-Phenylalanin			
Carbonsäuren	α-Keto-Buttersäure			
Carbonsäuren	α-Hydroxy-Buttersäure	ATP-dependent AMP binding enzyme	PGA1_262p01840	I
Amine	Putrescin			

Tabelle 4.3: Das 65 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Carbonsäure

†	Klasse	Substrat
	Carbonsäure	p-Hydroxy-Phenyllessigsäure

Tabelle 4.4: Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Mono-, Di- und Polysaccharide, sowie Alkohole durch zugehörige Kernenzyme

Klasse	Substrat	Kernenzym	Locus Tag	COG
Monosaccharide	D-Mannose	Alginate biosynthesis protein (algA)	PGA1_65p00290	G
		udp-glucose/gdp-mannose dehydrogenase	PGA1_262p02300	M
		GDP-L-fucose synthetase Fcl_[EC:1.1.1.271]	PGA1_65p00300	G
		GDP-mannose 4,6-dehydratase Gmd_[EC:4.2.1.47]	PGA1_65p00310	M
Monosaccharide	D-Fructose	aldose 1-epimerase (5.1.3.3)	PGA1_262p00390	G
Monosaccharide	N-Acetyl-D-Glucosamin	alcohol dehydrogenase Alk.J	PGA1_262p00210	G
Monosaccharide	D-Galactose	aldose 1-epimerase	PGA1_262p00390	G
Disaccharide	D-Trehalose			
Monosaccharide	D-Ribose			
Monosaccharide	D-Fucose			
Disaccharide	D-Melibiose			
Alkohole	D-Mannit			
Alkohole	D-Sorbit			
Alkohole	Ethanolamine			
Alkohole	D-Arabitol			
Alkohole	Myo-Inosit			

Tabelle 4.5: Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Aminosäuren oder Derivate durch zugehörige Kernenzyme

Klasse	Substrat	Kernenzym	Locus Tag		COG
Aminosäuren	L-Serin	putative sarcosine oxidase, nit_EC:1.5.3.1 _soxG	gamma	subu-PGA1_262p01490	E
		sarcosine oxidase subunit alpha_[EC:1.5.3.1]_soxA		PGA1_262p01500	
		sarcosine oxidase, delta subunit_[EC:1.5.3.1]_soxD		PGA1_262p01510	
		sarcosine oxidase 3 subunit beta_[EC:1.5.3.1]_soxB		PGA1_262p01520	
		metallophosphoesterase_[EC:3.1.3.16]_pphA		PGA1_262p00610	
		hypothetical protein		PGA1_65p00210	
Aminosäuren	L-Glutaminsäure L-Glutamine	putative histidine transport system permease protein HisQ		PGA1_262p02370	E
		putative histidine transport system permease protein HisM		PGA1_262p02380	
		methyltransferase_[EC:2.1.1.80]_cheR		PGA1_262p02100	
		putative mandelate racemase/muconate lactonizing enzyme		PGA1_262p00220	
Aminosäuren	L-Alanin				M
Aminosäuren	D-Alanin				
Aminosäuren	L-Prolin	putative proline racemase		PGA1_262p00280	E

Tabelle 4.6: Fortsetzung I. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Aminosäuren oder Derivate durch zugehörige Kernenzyme

Klasse	Substrat	Kernenzym	Locus Tag	COG
Aminosäuren	L-Threonin	Threonine dehydratase_[EC:4.3.1.15]	PGA1_262p00750	E
		putative acetolactate synthase isozyme 1 large subunit_[EC:2.2.1.6]_ilvB, ilvG, ilvI	PGA1_262p02320	
		metallophosphoesterase_[EC:3.1.3.16]_pphA	PGA1_262p00610	
Aminosäuren	Tyramin			R
Aminosäuren	L-Arginin	tRNA-Arg	PGA1_262p01070	E
		amidinotransferase_[EC:3.5.3.18]_putative aspartate aminotransferase_[EC:2.6.1.84]_aruH	PGA1_262p02310	
		histidine transport ATP-binding protein_[EC:3.6.3.-]_aotP	PGA1_262p02330	
		putative histidine-binding periplasmic protein	PGA1_262p02350	
		putative histidine transport system permease protein HisQ	PGA1_262p02360	
		putative histidine transport system permease protein HisM	PGA1_262p02370	
			PGA1_262p02380	
Aminosäuren	L-Lysin	putative histidine-binding periplasmic protein	PGA1_262p02360	E

Tabelle 4.7: Fortsetzung II. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Aminosäuren oder Derivate durch zugehörige Kernenzyme

Klasse	Substrat	Kernenzym	Locus Tag	COG
Aminosäuren	Glycin	dimethylglycine	PGA1_262p01400	E
		_DmgdH	PGA1_262p01490	
		putative sarcosine oxidase, gamma subunit_EC:1.5.3.1]_soxG	PGA1_262p01500	
		sarcosine oxidase subunit alpha_[EC:1.5.3.1]_soxA	PGA1_262p01510	
		sarcosine oxidase, delta subunit_[EC:1.5.3.1]_soxD	PGA1_262p01520	
		sarcosine oxidase 3 subunit beta_[EC:1.5.3.1]_soxB	PGA1_262p02210	
		FAD dependent oxidoreductase_		
Aminosäuren	L-Isoleucin	putative acetolactate synthase isozyme 1 large subunit_[EC:2.2.1.6]_ilvB, ilvG, ilvI	PGA1_262p02320	E
Aminosäuren	4-Hydroxy-L-Prolin (trans)	putative proline racemase	PGA1_262p00280	E
Aminosäuren	L-Homoserin			
Aminosäuren	L-Ornithin	histidine transport ATP-binding protein_[EC:3.6.3.-]_aotP	PGA1_262p02350 PGA1_262p02360	E
Aminosäuren	N-Acetyl-L-Glutaminsäure	putative histidine-binding periplasmic protein put. histidine trans. sys. permease protein HisQ put. histidine trans. sys. permease protein HisM put. mandelate racemase/muconate lactonizing enz.	PGA1_262p02370 PGA1_262p02380 PGA1_262p00220	E

Tabelle 4.8: Fortsetzung III. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Aminosäuren oder Derivate durch zugehörige Kernenzyme

Klasse	Substrat	Kernenzym	Locus Tag	COG
Aminosäuren	Glycyl-L-Asparaginsäure			
Aminosäuren	L-Alanyl-Glycin	dimethylglycine _DmgdH	dehydrogenase_[EC:1.5.8.4]	PGA1_262p01400 E
		putative sarcosine oxidase, nit_EC:1.5.3.1]_soxG	gamma subu-	PGA1_262p01490
		sarcosine oxidase subunit alpha_[EC:1.5.3.1]_soxA		PGA1_262p01500
		sarcosine oxidase, delta subunit_[EC:1.5.3.1]_soxD		PGA1_262p01510
		sarcosine oxidase 3 subunit beta_[EC:1.5.3.1]_soxB		PGA1_262p01520
		FAD dependent oxidoreductase_		PGA1_262p02210
Aminosäuren	Glycyl-L-Prolin	putative proline racemase		PGA1_262p00280 E
Aminosäuren	Glycyl-L-Glutaminsäure	put. histidine transp. system permease protein HisQ put. histidine transp. system permease protein HisM put. mandelate racemase/muconate lactonizing enzy- me	HisQ HisM enzym	PGA1_262p02370 E PGA1_262p02380 PGA1_262p00220 M

Tabelle 4.9: Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Carbonsäuren durch zugehörige Kernenzyme

Klasse	Substrat	Kernenzym	Locus Tag	COG
Carbonsäuren	Brenztraubensäure	Phosphoenolpyruvate synthase	PGA1_262p02280	G
		dikinase (2.7.9.2)		
		putative acetolactate synthase isozyme 1 large subunit [EC:2.2.1.6]_ilvB, ilvG, ilvI	PGA1_262p02320	E
Carbonsäuren	L-Milchsäure	malate/L-lactate dehydrogenase-like protein	PGA1_262p01410	C
	D-Äpfelsäure			
	L-Äpfelsäure			
	D,L-Äpfelsäure			
Carbonsäuren	Fumarsäure			
Carbonsäuren	D-Asparaginsäure			
Carbonsäuren	L-Asparaginsäure			
Carbonsäuren	Bernsteinsäure			
Carbonsäuren	Citronensäure			
Carbonsäuren	Ameisensäure			
Carbonsäuren	α-Keto-Valeriansäure			
Carbonsäuren	Methyl-Pyruvat			
Carbonsäuren	Propionsäure			

Tabelle 4.10: Fortsetzung I. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Carbonsäuren durch zugehörige Kernenzyme

	Klasse	Substrat	Kernenzym	Locus Tag	COG
†	Carbonsäuren	Natriumformiat			
	Carbonsäuren	b-Hydroxy-Buttersäure			

Tabelle 4.11: Das Chromosom und/oder das 78 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist relevant für die positive Reaktion der gelisteten Amino-, Carbonsäuren, sowie Nukleinsäuren durch zugehörige Kernenzyme

	Klasse	Substrat	Kernenzym	Locus Tag	COG
†	Aminosäuren	L-Histidin			
	Carbonsäuren	Essigsäure			
	Nukleinsäuren	Thymidin			
		Adenosin			
		Inosin			
		Uridin			

Tabelle 4.12: Sonderreaktionen von *P. inhibens* DSM 17395

	Klasse	Substrat	Diskrim.kombi.
†	Carbonsäure	Buttersäure	1201

Kapitel 5

Ergebnistabellen zu phänotypischem MicroArray (PM) - Chemikaliertoleranz

In diesem Kapitel sind zunächst mögliche Kernenzyme und zugehörige Stoffwechselwege bzw. Reaktionen der *P. inhibens* DSM 17395 Chromide der Größe 262 kb und 65 kb aufgeführt. Weiterhin sind die positiv getesteten Substrate der PM-Platten PM10-PM20 in tabellarischer Form gelistet und sortiert nach Genkompartimenten von *P. inhibens* DSM 17395 laut Diskriminanzanalyse, siehe Abbildung 2.1. Zusätzlich sind zu jedem Substrat inhaltliche Informationen aus den oben genannten Datenbanken, siehe 2.9, in der jeweils generierten Sprache beschrieben.

Tabelle 5.1: Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber anorganischen Stoffen von *P. inhibens* DSM 17395 Chromid 262 kb; COG-Kategorien K, P, Q, R.

Gruppe	Kernenzym	Stoffwechselweg/ Reaktion	Locus Tag
Nitrat	putative nmrS protein_nmrS	Uncharacterized protein involved in response to NO	PGA1_262p01170
	putative protein_norD		PGA1_262p01200
	nitric oxide reductase subunit	Nitric oxide reductase activation protein	PGA1_262p01220
	B_[EC:1.7.2.5]_norB	Denitrification, nitrate => nitrogen	PGA1_262p01210
	putative protein_norQ		PGA1_262p01260
Regulatoren	nitric oxide reductase NorQ		
	protein copper-containing nitrite reductase [EC:1.7.2.1]_nirK		
	transcriptional regulator, MerR family	The majority of regulators in the family respond to environmental stimuli, such as oxidative stress, heavy metals or antibiotics	PGA1_262p00460
	putative transcriptional regulator, ArsR family	The SmtB/ArsR family of prokaryotic metalloregulatory transcriptional repressors represses the expression of operons linked to stress-inducing concentrations of di- and multivalent heavy metal ions.	PGA1_262p01930
	sarcosine oxidase 3 subunit beta [EC:1.5.3.1]_soxB	Sox sulfur oxidation enzyme system	PGA1_262p00610

Tabelle 5.2: Fortsetzung. Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber anorganischen Stoffen von *P. inhibens* DSM 17395 Chromid 262 kb; COG-Kategorien E und P.

Gruppe	Kernenzym	Stoffwechselweg/ Reaktion	Locus Tag
Zink	putative membrane dipeptidase	Zn-dependent dipeptidase, microsomal dipeptidase homolog	PGA1_262p01450
	putative membrane dipeptidase	Zn-dependent dipeptidase, microsomal dipeptidase homolog	PGA1_262p01800
	putative metal ion uptake regulator	Fe2+/Zn2+ uptake regulation proteins; fur family: The ferric uptake regulator (Fur) protein, as originally described in <i>Escherichia coli</i> , is an iron-sensing repressor that controls the expression of genes for siderophore biosynthesis and iron transport.	PGA1_262p01580
	zinc uptake regulation protein	zur Fur family transcriptional regulator, zinc uptake regulator	PGA1_262p02230
	ABC transporter, periplasmic solute-binding protein_znuA	zinc transport system substrate-binding protein	PGA1_262p02220
	high-affinity zinc uptake system membrane protein_znuB	ABC-type Mn2+/Zn2+ transport systems, permease components	PGA1_262p02250
	zinc import	ABC-type Mn/Zn transport systems, ATPase component	PGA1_262p02240
	protein_[EC:3.6.3.-]_znuC		

Tabelle 5.3: Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber, z.B. multiplen Antibiotika, organischen Lösungsmitteln, Haushaltsdesinfektionsmitteln, oxidative Stressagentien oder Pathogenfaktoren von *P. inhibens* DSM 17395 Chromid 262 kb bzw. 65 kb; COG-Kategorien E, Q, R, V.

Gruppe	Kernenzym	Stoffwechselweg/ Reaktion	Locus Tag
Multidrogen/ -pheromon- transporter	dipeptide transport protein	Multidrug/pheromone exporter, ABC su- perfamily	PGA1_262p01010
	DppD		
	dipeptide transport system permease protein	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel	PGA1_262p01020
	DppC	transport systems, permease components	
	dipeptide transport system permease protein	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel	PGA1_262p01030
	DppB	transport systems, permease components	
	dipeptide transport ATP-binding prote- in_dppF	Multidrug/pheromone exporter, ABC su- perfamily	PGA1_262p01000
	histidine transport ATP-binding		
	protein_[EC:3.6.3.-]_HisP	Multidrug/pheromone exporter, ABC su- perfamily	PGA1_262p02350
	oligopeptide ABC transporter, ATP binding protein	Multidrug/pheromone exporter, ABC su- perfamily	PGA1_262p00340
	putative polysaccharide synthase	Multidrug/Oligosaccharidyl- lipid/Polysaccharide (MOP) Flippase Superfamily	PGA1_262p00370
	The putative multi antimicrobial extru- sion protein	The Multidrug/Oligosaccharidyl- lipid/Polysaccharide (MOP) Flippase Superfamily	PGA1_262p00520

Tabelle 5.4: Fortsetzung. Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber, z.B. multiplen Antibiotika, organischen Lösungsmitteln, Haushaltsdesinfektionsmitteln, oxidative Stressagentien oder Pathogenfaktoren von *P. inhibens* DSM 17395 Chromid 262 kb bzw. 65 kb; COG-Kategorien E, Q, V.

Gruppe	Kernenzym	Stoffwechselweg/ Reaktion	Locus Tag
Multidrogen/ -pheromon- transporter	putative ABC transporter, ATP binding protein	Multidrug/pheromone exporter, ABC superfamily	PGA1_262p01600
	putative amino-acid ABC transporter, ATP-binding protein_[EC:3.6.3.21]	Multidrug/pheromone exporter, ABC superfamily	PGA1_65p00130
	Thioesterase domains of type I polyketide synthases or non-ribosomal peptide synthetases	Thioesterase domains of type I polyketide synthases or non-ribosomal peptide synthetases	PGA1_65p00100

Tabelle 5.5: Fortsetzung I. Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber, z.B. multiplen Antibiotika, organischen Lösungsmitteln, Haushaltsdesinfektionsmitteln, oxidative Stressagentien oder Pathogenfaktoren von *P. inhibens* DSM 17395 Chromid 262 kb bzw. 65 kb; COG-Kategorien K und M.

Gruppe	Kernenzym	Stoffwechselweg/ Reaktion	Locus Tag
Multiple Antibiotika-resistenz-Regulatoren	transcriptional regulator, MerR family	The majority of regulators in the family respond to environmental stimuli, such as oxidative stress, heavy metals or antibiotics	PGA1_262p00460
	transcriptional regulator, MarR family	Proteins belonging to the Multiple antibiotic resistance Regulators (MarR) family reportedly regulate the expression of proteins conferring resistance to multiple antibiotics, organic solvents, household disinfectants, oxidative stress agents and pathogenic factors (Aleksun Levy, 1999a; Miller Sulavik, 1996; Aravind et al., 2005)	PGA1_262p01330
	transcriptional regulator, LysR family	LysR-type transcriptional regulators (LT-TRs) regulate a diverse set of genes, including those involved in virulence, metabolism, quorum sensing and motility	PGA1_262p00200
	transcriptional regulator, LysR family		PGA1_262p00990
	transcriptional regulator, LysR family		PGA1_262p01360
	transcriptional regulator, LysR family		PGA1_262p01470
	put. transcriptional regulator, LysR family		PGA1_262p01670
	transcriptional regulator, LysR family		PGA1_262p01780
	put. transcriptional regulator, LysR type		PGA1_262p02000

Tabelle 5.6: Fortsetzung II. Kernenzyme und Stoffwechselwege für Toleranzen gegenüber, z.B. multiplen Antibiotika, organischen Lösungsmitteln, Haushaltsdesinfektionsmitteln, oxidative Stressagentien oder Pathogenfaktoren von *P. inhibens* DSM 17395 Chromid 262 kb bzw. 65 kb; COG-Kat. K und M.

Gruppe	Kernenzym	Stoffwechselweg/ Reaktion	Locus Tag
Multiple Antibiotika-resistenz-Regulatoren	put. transcriptional regulator, AraC family	Transcriptional regulators of the AraC family	PGA1_262p01560
	put. transcriptional regulator, AraC family	are widespread among bacteria and regulate	PGA1_262p01870
	transcriptional regulator, AraC family	genes having diverse functions, ranging from	PGA1_262p01290
	transcriptional regulator, AraC family	carbon metabolism to stress responses to virulence	PGA1_262p01480
	putative ABC transporter, permease protein	ABC-type transport system, involved in lipoprotein release, permease component	PGA1_262p01610
	51-21-8 uracil DNA glycosylase-like protein in [EC:2.7.7.7]	a uracil analogue	PGA1_262p00560

Tabelle 5.7: Das 262 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Aromaten und Sekundärmetaboliten

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Aromaten	1,10-Phenanthroline	A heterocyclic organic compound
	3,5-Dinitrobenzoic Acid	
Sekundärmetabolite	Koffein	A methylxanthine naturally occurring in some beverages and also used as a pharmacological agent. Caffeine's most notable pharmacological effect is as a central nervous system stimulant, increasing alertness and producing agitation. It also relaxes SMOOTH MUSCLE, stimulates CARDIAC MUSCLE, stimulates DIURESIS, and appears to be useful in the treatment of some types of headache. Several cellular actions of caffeine have been observed, but it is not entirely clear how each contributes to its pharmacological profile. Among the most important are inhibition of cyclic nucleotide PHOSPHODIESTERASES, antagonism of ADENOSINE RECEPTORS, and modulation of intracellular calcium handling. An alkaloid, originally from <i>Atropa belladonna</i> , but found in other plants, mainly SOLANACEAE.
	Atropin	
	4-Hydroxycumarin	

Tabelle 5.8: Das 262 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Anorganische Stoffe und Halogene (x = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl)

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Anorganische Stoffe	Caesiumchlorid	Alkali metal compound
	Rutheniumrot	An inorganic dye used in microscopy for differential staining and as a diagnostic reagent. In research this compound is used to study changes in cytoplasmic concentrations of calcium. Ruthenium red inhibits calcium transport through membrane channels.
	Aluminiumsulfat	Post-transition metal compound
	Chrom(III)-chlorid	Transition metal compound
	Methyltriocetylammoniumchlorid	
Halogene	X-SO ₄	Chloroxyleneol

Tabelle 5.9: Das 262 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Zytostatika – Antimetabolite

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Zytostatika Antimetabolite	5-Fluorouracil	A pyrimidine analog that is an antineoplastic antimetabolite. It interferes with DNA synthesis by blocking the THYMIDYLATE SYNTHETASE conversion of deoxyuridylic acid to thymidylic acid.
	Mercaptapurin	Purinanaloga
	Cytarabin	Pyrimidinanaloga
	4-Aminopyridin	One of the POTASSIUM CHANNEL BLOCKERS, with secondary effect on calcium currents, which is used mainly as a research tool and to characterize channel subtypes.
	Benserazid	An inhibitor of DOPA DECARBOXYLASE that does not enter the central nervous system. It is often given with LEVODOPA in the treatment of parkinsonism to prevent the conversion of levodopa to dopamine in the periphery, thereby increasing the amount that reaches the central nervous system and reducing the required dose. It has no antiparkinson actions when given alone.
	Cetylpyridinium-chloride	A pyrimidine analog

Tabelle 5.10: Das 262 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Zytostatika – Antibiotika

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Zytostatika Antibiotika Aminoglykoside	Hygromycin B Streptomycin	Aminoglycoside produced by <i>Streptomyces hygroscopicus</i> . It is used as an anthelmintic against swine infections by large roundworms, nodular worms, and whipworms. An antibiotic produced by the soil actinomycete <i>Streptomyces griseus</i> . It acts by inhibiting the initiation and elongation processes during protein synthesis.
	Amikacin	broad-spectrum antibiotic derived from KANAMYCIN. It is reno- and oto-toxic like the other aminoglycoside antibiotics.
	Geneticin Apramycin	
Zytostatika Antibiotika Cephalosporine	Cefotaxime	Semisynthetic broad-spectrum cephalosporin. Antibiotic Cephalosporins (Third generation).
Zytostatika Antibiotika Glykopeptide	Bleomycin	A complex of related glycopeptide antibiotics from <i>Streptomyces verticillus</i> consisting of bleomycin A2 and B2. It inhibits DNA metabolism and is used as an antineoplastic, especially for solid tumors.
Zytostatika Antibiotika Phosphomycine	Phosphomycin	An antibiotic produced by <i>Streptomyces fradiae</i> .

Tabelle 5.11: Fortsetzung. Das 262 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Zytostatika – Antibiotika

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Zytostatika Antibiotika Polypeptide	Capreomycin	Cyclic peptide antibiotic similar to VIOMYCIN. It is produced by Streptomyces capreolus.
	Colistin	Cyclic polypeptide antibiotic from Bacillus colistinus. It is composed of Polymyxins E1 and E2 (or Colistins A, B, and C) which act as detergents on cell membranes. Colistin is less toxic than Polymyxin B, but otherwise similar; the methanesulfonate is used orally.
	Norfloxacin	A synthetic fluoroquinolone (FLUOROQUINOLONES) with broad-spectrum antibacterial activity against most gram-negative and gram-positive bacteria. Norfloxacin inhibits bacterial DNA GYRASE.
Zytostatika Antibiotika Chinolone	Nalidixinsäure	A synthetic 1,8-naphthyridine antimicrobial agent with a limited bacteriocidal spectrum. It is an inhibitor of the A subunit of bacterial DNA GYRASE.
	Cinoxacin	Synthetic antimicrobial related to OXOLINIC ACID and NALIDIXIC ACID and used in URINARY TRACT INFECTIONS.
	Sulfamilamid	Antibiotic Sulfonamides
Zytostatika Antibiotika Sulfonamide	Ornidazol	
	Nitroimidazole	

Tabelle 5.12: Das 262 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Psychopharmaka, Antiseptika und Biozide

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Psychopharmaka	Amitriptylin	Antidepressivum
Antiseptika	Dequalinium	A topical bacteriostat that is available as various salts. It is used in wound dressings and mouth infections and may also have antifungal action, but may cause skin ulceration.
Biozide	Dodin	Verbindung aus Gruppe der Guanidinsalze
	Patulin	Mykotoxin
	Hexachlorophen	A chlorinated bisphenol antiseptic with a bacteriostatic action against Gram-positive organisms, but much less effective against Gram-negative organisms. It is mainly used in soaps and creams and is an ingredient of various preparations used for skin disorders. (From Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30th ed, p797)

Tabelle 5.13: Das 262 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen von unkategorisierten Substraten

	Gruppe	Substrat	Beschreibung
†	Chemikalien unklassifiziert	Diamid	A sulfhydryl reagent which oxidizes sulfhydryl groups to the disulfide form. It is a radiation-sensitizing agent of anoxic bacterial and mammalian cells.
		Thiosalicylat Disulphiram	Entwöhnungsmittel bei Alkoholabhängigkeit A nitroimidazole anti-protozoal agent used in ameba and trichomonas infections. It is partially plasma-bound and also has radiation-sensitizing action.

Tabelle 5.14: Das 65 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Sekundärmetabolite und Halogene (x = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl)

	Gruppe	Substrat	Beschreibung
†	Sekundär- metabolite	Lignan Nordihydroguaiarensäure (NDGA)	
		X-b-D-Galactosid X-a-D-Mannosid	

Tabelle 5.15: Das 65 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten Zytostatika – Antibiotika, Antimetaboliten und weiteren Chemikalien

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Zytostatika Antibiotika Aminoglykoside	Dihydrostreptomycin	A semi-synthetic aminoglycoside antibiotic that is used in the treatment of TUBERCULOSIS.
Zytostatika Antibiotika Glykopeptide	Phleomycin	Ein kupferchelatierendes Glykopeptidantibiotikum. Bekannt ist es vor allem unter dem Handelsnamen Zeocin, welches hauptsächlich Phleomycin D1 beinhaltet. Es gehört zu der Familie der Bleomycine und wird ebenfalls aus einer Mutante von <i>Streptomyces verticillus</i> isoliert.
Zytostatika Antibiotika Nitrofurane	Nitrofurazon	A topical anti-infective agent effective against gram-negative and gram-positive bacteria. It is used for superficial WOUNDS AND INJURIES and skin infections. Nitrofurazone has also been administered orally in the treatment of TRYPAUSOMIASIS.
Antimetabolit	Hydroxyurea	An antineoplastic agent that inhibits DNA synthesis through the inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase. Hydroxyurea a secondary metabolite antiretroviral agent.
Chemikalien unklassifiziert	Procain	A local anesthetic of the ester type that has a slow onset and a short duration of action. It is mainly used for infiltration anesthesia, peripheral nerve block, and spinal block. (From Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30th ed, p1016). Sekundärstoff des Kreosotbusch (<i>Larrea tridentata</i>); oxidationshemmend, analgetisch, enzymhemmend, antidiabetisch und antitumoral.

Tabelle 5.16: Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Aminosäuren, Aromaten, Sekundärmetabolite

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Amino-säuren	Glycin	Glycine betaine degradation. Glycine, serine and threonine metabolism
	D,L-Serin-Hydroxamat	
	b-Chloro-L-Alanin	
	L-Glutaminsäure-g-hydroxamat	
Aromaten	1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen	A skin irritant that may cause dermatitis of both primary and allergic types. Contact sensitization with DNCB has been used as a measure of cellular immunity. DNCB is also used as a reagent for the detection and determination of pyridine compounds. A toxic dye, chemically related to trinitrophenol (picric acid), used in biochemical studies of oxidative processes where it uncouples oxidative phosphorylation. It is also used as a metabolic stimulant. (Stedman, 26th ed)
	2,4-Dinitrophenol	
Sekundär-metaboliten	Sanguinarin	an alkaloid, a salt
	Chelerythrin	An alkaloid, z.B. aus <i>Chelidonium majus</i>
	Plumbagin	A chinolin

Tabelle 5.17: Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Anorganischen Stoffe

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Anorganische Stoffe	Nickelchlorid	
	Kaliumchromat	Transition metal compound
	Natriumcyanat	Nonmetal compound
	Natriumdichromat	Transition metal compound
	Natriumarsenat	Metalloid compound
	Borsäure	Metalloid compound
	Zinkchlorid	Transition metal compound
	Natriummetaborat	Metalloid compound
	Natriumwolframat	Transition metal compound
	Natriumperiodat	
	Hexaammincobalt(III)-chlorid	
	Kaliumtellurit	

Tabelle 5.18: Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Halogene (x = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl)

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Halogene	Benzethoniumchlorid	Bactericidal cationic quaternary ammonium surfactant used as a topical anti-infective agent. It is an ingredient in medicaments, deodorants, mouthwashes, etc., and is used to disinfect apparatus, etc., in the food processing and pharmaceutical industries, in surgery, and also as a preservative. The compound is toxic orally as a result of neuromuscular blockade.
	X-b-D-Glucosaminid	
	X-b-D-Glucuronid	
	X-PO ₄	
	Iodessigsäure	
	5-Chlor-7-Iod-8-Hydroxychinolin	
	5,7-Dichlor-8-Hydroxychinaldin	
	5,7-Dichlor-8-Hydroxychinolin	
	Hydrochlorid	
	5-Fluoroorotsäure	

Tabelle 5.19: Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Psychopharmaka, der Antiseptika, der Zytostatika – Antimetabolite, sowie – Antibiotika

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Psycho- pharmaka	Promethazin	A phenothiazine derivative with histamine H1-blocking, antimuscarinic, and sedative properties. It is used as an antiallergic, in pruritus, for motion sickness and sedation, and also in animals.
	Alexidin	
Antiseptika	5-Azacytidin	A pyrimidine analogue that inhibits DNA methyltransferase, impairing DNA methylation. It is also an antimetabolite of cytidine, incorporated primarily into RNA. Azacytidine has been used as an antineoplastic agent.
Zytostatika	Tobramycin	An aminoglycoside, broad-spectrum antibiotic produced by Streptomyces tenebrarius. It is effective against gram-negative bacteria, especially the PSEUDOMONAS species. It is a 10% component of the antibiotic complex, NEBRAMYCIN, produced by the same species.
Antibiotika	Paromomycin	An oligosaccharide antibiotic produced by various STREPTOMYCES.
Aminoglykoside	Sisomicin	Antibiotic produced by Micromonospora inyoensis. It is closely related to gentamicin C1A, one of the components of the gentamicin complex (GENTAMICINS).
	Gentamicin	A complex of three different closely related aminoglycoside sulfates, Gentamicins C1, C2, and C1(subA), obtained from Micromonospora purpurea and related species. They are broad-spectrum antibiotics, but may cause ear and kidney damage. They act to inhibit protein synthesis (GENETIC TRANSLATION).

Tabelle 5.20: Fortsetzung. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antibiotika

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Zytostatika Antibiotika Aminoglykoside	Kanamycin	Antibiotic complex produced by <i>Streptomyces kanamyceticus</i> from Japanese soil. Comprises 3 components: kanamycin A, the major component, and kanamycins B and C, the minor components.
	Neomycin	Antibiotic complex produced by <i>Streptomyces fradiae</i> . It is composed of neomycins A, B, and C. It acts by inhibiting translation during protein synthesis.
Zytostatika Antibiotika Cephalosporine	Ceftriaxon	A broad-spectrum cephalosporin antibiotic with a very long half-life and high penetrability to meninges, eyes and inner ears. Antibiotic Cephalosporins (Third generation).
	Cefazolin	A semisynthetic cephalosporin analog with broad-spectrum antibiotic action due to inhibition of bacterial cell wall synthesis. It attains high serum levels and is excreted quickly via the urine. Antibiotic Cephalosporins (First generation).
	Cefuroxim	Die Substanz wird in der Medizin als Antibiotikum eingesetzt und zählt zu den Cephalosporinen der zweiten Generation. Die bakterizide Wirkung beruht auf einer Hemmung eines Enzyms, das für den Aufbau der Peptidoglycan-Zellwand benötigt wird.
Zytostatika Antibiotika Lincosamide	Lincomycin	An antibiotic produced by <i>Streptomyces lincolnensis</i> var. <i>lincolnensis</i> . It has been used in the treatment of staphylococcal, streptococcal, and Bacteroides fragilis infections.

Tabelle 5.21: Fortsetzung I. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antibiotika

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Zytostatika Antibiotika Nitrofurane	Nitrofurantoin Furaltadon	A urinary anti-infective agent effective against most gram-positive and gram-negative organisms. Although sulfonamides and antibiotics are usually the agents of choice for urinary tract infections, nitrofurantoin is widely used for prophylaxis and long-term suppression.
Zytostatika Antibiotika Nitroimidazole	2-Nitroimidazol	
Zytostatika Antibiotika Penicilline	Piperacillin Ampicillin	Semisynthetic, broad-spectrum, AMPICILLIN derived ureidopenicillin antibiotic proposed for PSEUDOMONAS infections. It is also used in combination with other antibiotics. Aufgrund seiner Wirksamkeit gegen grampositive Erreger (sowie einige gramnegative Stäbchen) wird es als Breitbandantibiotikum oder Breitbandpenicillin bezeichnet.
Zytostatika Antibiotika Polypeptide	8-Hydroxychinolin Polymyxin B	A mixture of polymyxins B1 and B2, obtained from <i>Bacillus polymyxa</i> strains. They are basic polypeptides of about eight amino acids and have cationic detergent action on cell membranes. Polymyxin B is used for infections with gram-negative organisms, but may be neurotoxic and nephrotoxic. A mixture of polymyxins B1 and B2, obtained from <i>Bacillus polymyxa</i> strains. They are basic polypeptides of about eight amino acids and have cationic detergent action on cell membranes. It is used for infections with gram-negative organisms, but may be neurotoxic and nephrotoxic.

Tabelle 5.22: Fortsetzung II. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antibiotika

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Zytostatika Antibiotika Chinolone	Ciprofloxacin	A broad-spectrum antimicrobial carboxyfluoroquinoline.
	Oxolinsäure	Synthetic antimicrobial related to NALIDIXIC ACID and used in URINARY TRACT INFECTIONS.
	Enoxacin	A broad-spectrum 6-fluoronaphthyridinone antibacterial agent (FLUOROQUINOLONES) structurally related to NALIDIXIC ACID.
	Lomefloxacin	Gehört zur Gruppe der Fluorchinolone. Es wird zur Behandlung von bakteriellen Infektionen in der Augenheilkunde und der Allgemeinmedizin eingesetzt.
	Ofloxacin	A synthetic fluoroquinolone (FLUOROQUINOLONES) antibacterial agent that inhibits the supercoiling activity of bacterial DNA GYrase, halting DNA REPLICATION.
Zytostatika Antibiotika Tetracykline	Pipemidsäure	Antimicrobial against Gram negative and some Gram positive bacteria. It is protein bound and concentrated in bile and urine and used for gastrointestinal, biliary, and urinary infections.
	Tetracyclin	A naphthacene antibiotic that inhibits AMINO ACYL TRNA binding during protein synthesis.

Tabelle 5.23: Fortsetzung III. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antibiotika und Biozide

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Zytostatika Antibiotika Sulfonamide	Sulfisoxazol	A short-acting sulfonamide antibacterial with activity against a wide range of gram-negative and gram-positive organisms.
	Trimethoprim	A pyrimidine inhibitor of dihydrofolate reductase, it is an antibacterial related to PYRIMETHAMINE. The interference with folic acid metabolism may cause a depression of hematopoiesis. It is potentiated by SULFONAMIDES and the TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE COMBINATION is the form most often used. It is sometimes used alone as an antimalarial. TRIMETHOPRIM RESISTANCE has been reported.
	Sulfadiazin	One of the short-acting SULFONAMIDES used in combination with PYRIMETHAMINE to treat toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome and in newborns with congenital infections.
	Sulfamethazin	A sulfanilamide anti-infective agent. It has a spectrum of antimicrobial action similar to other sulfonamides.
	Sulfamethoxazol	A bacteriostatic antibacterial agent that interferes with folic acid synthesis in susceptible bacteria. Its broad spectrum of activity has been limited by the development of resistance. (From Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30th ed, p208)
Biozide	Sulfathiazol	
	Pentachlorophenol 3-Amino-1,2,4-triazol	Pestizid Herbizid

Tabelle 5.24: Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 kb großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten unkategorisierten Substrate

	Gruppe	Substrat	Beschreibung
†	Chemikalien unklassifiziert	2,4-Diamino-6,7-Diisopropylpteridin 5-Fluoroorotsäure	

Tabelle 5.25: Fortsetzung. Das 262 kb große Chromid in Kombination mit dem 65 k -großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der gelisteten unkategorisierten Substrate

	Gruppe	Substrat	Beschreibung
†	Chemikalien unklassifiziert	Lidocain	A local anesthetic and cardiac depressant used as an antiarrhythmia agent. Its actions are more intense and its effects more prolonged than those of procaine but its duration of action is shorter than that of bupivacaine or prilocaine.
		18-Kronen-6-ether Semicarbazid	Derivat des Harnstoffs

Tabelle 5.26: Das Chromosom und/oder das 78 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Aminosäuren, Aromaten und Sekundärmetaboliten

	Gruppe	Substrat	Beschreibung
†	Aminosäuren	pH 9.5 + L-Glutamin pH 9.5 + L-Alanin pH 9.5 + L-Asparagin pH 9.5 + L-Threonin pH 9.5 + Hydroxy-L-Prolin pH 9.5 + 4-Hydroxy-L-Prolin [trans]	
	Sekundärmetabolite	Myricetin Fusarinsäure 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon (Lawsone)	A flavonoid, a flavonol. Carbonsäure Henna-Extrakt

Tabelle 5.27: Das Chromosom und/oder das 78 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Anorganischen Stoffe und Halogene (x = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl)

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Anorganische Stoffe	Natriumnitrit	Nitrous acid sodium salt. Used in many industrial processes, in meat curing, coloring, and preserving, and as a reagent in ANALYTICAL CHEMISTRY TECHNIQUES. It is used therapeutically as an antidote in cyanide poisoning. The compound is toxic and mutagenic and will react in vivo with secondary or tertiary amines thereby producing highly carcinogenic nitrosamines.
	Natriumazid	A cytochrome oxidase inhibitor which is a nitridizing agent and an inhibitor of terminal oxidation. (From Merck Index, 12th ed)
	Natriummetasilicat	Metalloid compound
	X-Caprylat	
Halogene	X-a-D-Galactosid	
	X-a-D-Glucosid	
	X-a-D-Glucuronid	
	X-b-D-Galactosid	
	X-b-D-Glucosid	

Tabelle 5.28: Das Chromosom und/oder das 78 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antimetabolite, sowie Antibiotika

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Zytostatika Antimetabolite	Guanazol Azathioprin	(Purinanaloga) antitumor activity (Purinanaloga) An immunosuppressive agent used in combination with cyclophosphamide and hydroxychloroquine in the treatment of rheumatoid arthritis. According to the Fourth Annual Report on Carcinogens (NTP 85-002, 1985), this substance has been listed as a known carcinogen. (Merck Index, 11th ed)
Zytostatika Antibiotika Monobactame	Aztreonam	A monocyclic beta-lactam antibiotic originally isolated from Chromobacterium violaceum. It is resistant to beta-lactamases and is used in gram-negative infections, especially of the meninges, bladder, and kidneys. It may cause a superinfection with gram-positive organisms.
Zytostatika Antibiotika Nitroimidazole	Timidazol	Wirkt bakterizid gegen fast alle anaeroben Bakterien (außer Aktinomyzeten und Propionibakterien) und viele Protozoen.

Tabelle 5.29: Das Chromosom und/oder das 78 kb große Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 ist tolerant zu den positiv getesteten Reaktionen der Zytostatika – Antibiotika, Biozide und unkategorisierten Substrate

Gruppe	Substrat	Beschreibung
Zytostatika Antibiotika Thioamide	Ethionamid	A second-line antitubercular agent that inhibits mycolic acid synthesis.
Biozide	2-Phenylphenol- methylviolegen	Konservierungsmittel A poisonous dipyrilidium compound used as contact herbicide. Contact with concentrated solutions causes irritation of the skin, cracking and shedding of the nails, and delayed healing of cuts and wounds.
Chemikalien unklassifiziert	Kristallviolett	Um Gewebe gezielt zu markieren und für die Gewebeentnahme voneinander unterscheidbar zu machen (z.B in der Katarakt-, Hornhaut oder Netzhautchirurgie) kommen seit der Jahrtausendwende Triphenylmethanfarbstoffe wie Coomassie-Brillant-Blau, Bromphenolblau, Patentblau V oder Kristallviolett in der Chirurgie zum Einsatz. Auch Tumordiagnosen oder die Behandlung von Hautpilzen (fungizide Wirkung von Kristallviolett) wurden beschrieben.

Tabelle 5.30: Sonderreaktionen von *P. inhibens* DSM 17395

Klasse	Substrat	Beschreibung	Diskrim. kombi.
Aminosäuren	Poly-L-Lysin		0020
Sekundär- metabolite	Cumarin	A flavonoid.	0120
	Harman	An alkaloid.	1220
Anorganische Stoffe	Lithiumchlorid	A salt of lithium that has been used experimentally as an immunomodulator.	1020
	Hydroxylamin	Hydroxylamin wandelt Cytosin durch Hydrolyse zu Uracil	1220
	Phenylarsinoxid	inhibits guanine nucleotide binding of Rho but not of Rac GTPases	1221
Halogene	5-Fluor-5'-Deoxyuridin		1220
Zytostatika Alkylanzien	Chlorambucil	A nitrogen mustard alkylating agent used as antineoplastic for chronic lymphocytic leukemia, Hodgkin's disease, and others. Although it is less toxic than most other nitrogen mustards, it has been listed as a known carcinogen in the Fourth Annual Report on Carcinogens (NTP 85-002, 1985). (Merck Index, 11th ed)	1020
Zytostatika Antimetabolite	Trifluorothymidin	(Pyrimidinanaloga) Antimetabolit/ antiviral	1120

Tabelle 5.31: Sonderreaktionen von *P. inhibens* DSM 17395

Klasse	Substrat	Beschreibung	Diskrim. kombi.
Biozide	Chlorhexidin	Bakterizid, Antiseptikum	0120
	Blasticidin S	Fungizid, Nukleosid-Antibiotika	1120
	Triclosan	An antibacterial and antifungal agent found in consumer products, including toothpaste, soaps, detergents, toys, and surgical cleaning treatments. Its efficacy as an antimicrobial agent, the risk of antimicrobial resistance, and its possible role in disrupted hormonal development remain controversial. Additional research seeks to understand its potential effects on organisms and environmental health.	0220
Psycho- pharmaka	Oxycarboxin	Fungizid	1220
	Chlorpromazin	The prototypical phenothiazine antipsychotic drug. Like the other drugs in this class chlorpromazine's antipsychotic actions are thought to be due to long-term adaptation by the brain to blocking DOPAMINE RECEPTORS. Chlorpromazine has several other actions and therapeutic uses, including as an antiemetic and in the treatment of intractable hiccup.	1120

Tabelle 5.32: Sonderreaktionen von *P. inhibens* DSM 17395

Klasse	Substrat	Beschreibung	Diskrim. kombi.
Zytostatika Antibiotika Cephalosporine	Cefoperazon	Semisynthetic broad-spectrum cephalosporin with a tetrazolyl moiety that is resistant to beta-lactamase. It has been proposed especially against <i>Pseudomonas</i> infections.	1120
	Cefamandole	A second-generation broad-spectrum cephalosporin antibiotic. The clinically used form of cefamandole is the formate ester cefamandole nafate, a prodrug which is administered parenterally. Cefamandole is no longer available in the United States.	1120
Zytostatika Antibiotika Sulfonamide	Sulfamonomethoxin	Long acting sulfonamide antibacterial agent.	1120
	Sulfachloropyridazin		1120
Metabolite	D,L-a-Liponsäure	Naturstoff, der als Coenzym und Bestandteil des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes in den Mitochondrien in fast allen Eukaryoten vorkommt.	1220
	Pyrophosphat	Stoffwechselzwischenprodukt	1220
Chemikalien unklassifiziert	Compound 48/80	mast cell degranulation	1120

Kapitel 6

Diskussion

6.1 Die Bedeutung der extrachromosomalen Elemente für die Biofilmbildung innerhalb der *Roseobacter*-Klade

Als sogenannte *City of Microbes* [WK00] bilden Biofilme komplexe Mikrostrukturen und Möglichkeiten zur Kommunikation (*quorum-sensing*) (QS) untereinander. Dies gilt insbesondere für Vertreter der *Roseobacter*-Klade [CB13]. Die Mikroorganismen im Biofilm sind in einer Matrix aus Exopolysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden als kooperatives Konsortium gebunden [MRB⁺11]. Biofilme entstehen als dreidimensionale Architekturen z.B. an Oberflächen in nährstoffreichen Gewässern und in oligotrophen Habitaten, wie Wasserpipelines. Die Matrix dient nicht nur als Verdauungs- und Recyclingmöglichkeit, sondern auch als Schutzwall gegen Austrocknung, angereicherte Biozide, einige Antibiotika, metallische Kationen, Ultraviolette Strahlung, viele Protozoen und als eine Immunabwehr. [FW10]

6.1.1 *Phaeobacter inhibens* DSM 17395

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung des Meeresbakteriums *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 der *Roseobacter*-Klade ist ein bedeutungsvolles Chromid-kodiertes Charakteristikum. Die genetische Analyse der Klassifizierung mittels COG-Kategorien, siehe Abbildung 3.1, des Bakteriums zeigt, dass die hervorstechende Kategorie *M* mit biofilm-assoziierten genetischen Informationen besonders stark auf dem kleinsten 65 kb-großen Chromid vertreten ist. Die selbe

COG-Kategorie ist ebenfalls, wenn auch in deutlich geringerer Intensität, auf dem größten 262 kb-großen Chromid vertreten. [Tagungsbeiträge MIMAS und VAAM] Des Weiteren sind auf den Chromiden Genomsequenzen, siehe Abbildung 3.2, zu der Synthese von *Rhamnose*, *Fucose*, *Glucuronsäure*, Peptidoglycan sowie Polysacchariden und deren Transport und dem Transkriptionsfaktor *luxR* zugegen. Homologe der *lux* Gene sind relevant für *Acyl-Homoserinlactone* (AHL)-basierte QS-Mechanismen und weit verbreitet innerhalb der *Roseobacter*-Klade [ZLFH14].

Die physiologische phänotypische Analyse mittels Biofilmassay unterstützt die Resultate der Genomik im vollen Umfang, siehe Abbildung 3.4. Resultierend ist das Bakterium unter den Versuchsbedingungen in nährstoffreichem *MB*-Medium ohne das kleinste 65 kb-Chromid nahezu nicht mehr in der Lage einen Biofilm zu bilden. Ohne das größte 262 kb-Chromid ist eine Biofilmbildung möglich, jedoch in abgeschwächterer Form. Abbildung 3.4 Die Mutante ohne das 65 kb-Chromid verliert nicht nur ihre abiotische Fähigkeit, sondern auch ihre biotische Fähigkeit Biofilme zu bilden [FMP⁺15]. Zusätzlich zeigte die Mutante keine flagellare Motilität mehr, was sich durch eine alternative Regulierung durch einen Sigma-Faktor *alg* begründen könnte, wie Garrett *et. al* es in ihrer Studie beschreiben. Während die Alginatsynthese positiv reguliert ist, wird die Synthese des Flagellums durch den Sigmafaktor 22 negativ reguliert [GPW99]. Das suggeriert, dass bei einer Synthese von Exopolysacchariden Alginat in biofilm-assoziierten Zellen angereichert wird und die Synthese von Flagellen zurückgeht. Um ein produktives Mitglied der Biofilm-Matrix zu werden, muss das Bakterium unterscheiden, damit die 3-D-Struktur nicht durch ein Flagellum destabilisiert wird [WK00]. Auf dem 65 kb-großen extrachromosomalen Element befindet sich ein solch potentieller Sigma-Faktor *algA* (PGA1_65p00290), siehe Tabelle 4.4, der für die Regulierung der Flagellensynthese verantwortlich sein könnte.

6.1.2 *Roseobacter*-Klade

Biofilme sind geeignete Matrizen für einen horizontalen Gentransfer (HGT), da sie eine hohe mikrobielle Dichte und metabolische Aktivität aufweisen [SBH⁺05]. Durch die herausstechende Chromid-kodierte Fähigkeit zur Biofilmbildung von *P. inhibens* DSM 17395, lag die Untersuchung der extrachromosomalen Elemente weiterer Spezies der *Roseobacter*-Klade in Bezug auf die

Fähigkeit zur Biofilmbildung nahe.

Zunächst wurden mit einem *in silico*-Vergleich mögliche und verfügbare Kandidaten evaluiert. Dafür wurde ein Genomsequenzannotations-Vergleich von folgenden biofilm-assoziierten [LJ10] extrachromosomalen Elementen (ECE) von Spezies der *Roseobacter*-Klade mittels *RAST-Blast* [ABB⁺08] durchgeführt, siehe Abbildung 3.2:

- pPnh65: 65 kb-großes ECE von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395,
- pLale69: 69 kb-großes ECE von *Labrenzia alexandrii* DSM 17067^T,
- pRden69: 69 kb-großes ECE von *Roseobacter denitrificans* DSM 7001^T,
- pMalg53: 53 kb-großes ECE von *Marinovum algicola* DG898,
- pDshi86: 86 kb-großes ECE von *Dinoroseobacter shibae* DSM 16493^T,
- pRlit83: 83 kb-großes ECE von *Roseobacter litoralis* DSM 6996^T
- pRlit64: 64 kb-großes ECE von *Roseobacter litoralis* DSM 6996^T

Der anschließende *in vitro*-Vergleich der *Roseobacter*-Spezies:

- Phaeobacter inhibens* DSM 17395,
- Marinovum algicola* DG898,
- Marinovum algicola* DSM 10251^T,
- Dinoroseobacter shibae* DSM 16493^T,
- Roseobacter litoralis* DSM 6996^T,
- Roseobacter denitrificans* DSM 7001^T

erbrachte den physiologischen Nachweis zur Fähigkeit der abiotischen Biofilmbildung in nährstoffreichem Marine-Broth sowie in nährstoffarmen Salzwassermedium. Das Ergebnis ist in einem Boxplot dargestellt, siehe Abbildung 3.3 und zeigt, dass unter eutrophen Bedingungen alle Kandidaten außer *R. litoralis* DSM 6996^T abiotische Biofilme bilden. Die Spezies *P. inhibens* DSM 17395 und *M. algicola* DG898 bildeten die stärksten Biofilme aus, ebenfalls dokumentiert in [FGPP15].

Durch die extrachromosomalen Elemente ist *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 in der Lage einen abiotischen Biofilm zu bilden. Starke genotypische sowie phänotypische Indizien deuten darauf hin, dass dies auch für die Kandidaten *Marinovum algicola* DG898, *Marinovum algicola* DSM 10251^T, *Dinoroseobacter shibae* DSM 16493^T und *Roseobacter denitrificans* DSM 7001^T der *Roseobacter* Klade gilt, auch weiterführend dokumentiert in [MFB⁺16].

6.2 *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 und Chromidmutanten *Genotyp/Phänotyp* - Kohlenstoffquellen (PM01/PM02)

Die Analyse der 190 Kohlenstoffquellen mittels der phänotypischen MicroArray-Technologie wurde angewandt, um den Umfang der Substratquellen von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 und der drei Chromid-Mutanten zu ermitteln, die von den Bakterienstämmen respirativ genutzt werden. Insgesamt wurden 77 Substrate genutzt. Des Weiteren konnte die Bedeutung der Chromide des Bakteriums für die Respiration der Kohlenstoffquellen durch die Diskriminanzanalyse detektiert werden. Die größte Bedeutung war bei der Kombination der genetischen Information des 262 kb-Chromids und des 65 kb-Chromids zu verzeichnen: 49 positive Reaktionen. Diesem Ergebnis folgten 19 positiven Reaktionen durch die genetische Information des großen 262 kb-Chromid. Die genetische Information des kleinen Chromids ergab ein positives Ergebnis und der genetische Code des Chromosoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids folgte sechs positive Reaktionen. Ferner gab es zwei Sonderreaktionen. Folglich konnten insgesamt 69 positive PM-Ergebnisse auf die genetische Information des großen und/ oder des kleinen Chromids zurück geführt werden, was die Bedeutsamkeit der Chromide von *P. inhibens* DSM 17395 in Bezug auf Kohlenstoffwechsel deutlich macht. Zusätzlich diente die Analyse als ergänzende und zukünftig gegebenenfalls als teilweise ersetzende Methode zur Charakterisierung von Bakterien im Rahmen der Systematisierung der *Phaeobacter*-Stämme [BPG⁺13]. Zur Charakterisierung des Genotyps wurden die Ergebnisse der Klassifizierung zu der Homologie in biologisch sinnvolle Klassen von Genen (COG), siehe Abbildung 3.1, sowie die Informationen aus den Datenbanken, aufgelistet in Abschnitt 2.9, zu Kernenzymen mit zugehörigen *Locus-Tags* und zugehörigen Stoffwechselwegen beziehungsweise Reaktionen, herangezogen.

6.2.1 Transport- und Abbaustoffwechselwege – Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg

Der Glucoseabbau wird in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 über den Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg (ED) metabolisiert [FPT⁺09], da *Phosphofructo-*

kinase (pfk) des Embden-Meyerhof-Parnas-Stoffwechselwegs (EMP) nicht detektiert werden konnte und das Kernmetabolit des ED-Stoffwechselwegs *2-Keto-3-Desoxygluconat* vorhanden ist [ZTS⁺09]. Die Energieausbeute in Form von *Adenosintriphosphat* (ATP) beträgt nur ein ATP, während sie beim Embden-Meyerhof-Parnas-Weg zwei ATP beträgt. Dafür werden im ED-Stoffwechselweg jeweils eine Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH (phosphorylierte Form des Coenzym NADH) erzeugt, im EMP-Stoffwechselweg hingegen nur ein NADH. Der ED-Stoffwechselweg kann zudem organische Säuren metabolisieren, die durch den EMP-Stoffwechselweg nicht verwendet werden können. Die peripheralen Abbaustoffwechselwege speisen den ED-Stoffwechselweg, der mit dem unteren Zweig des EMP-Stoffwechselweg verbunden ist [WHW⁺14]. Abbildung 6.1 stellt die Transport- und Abbaustoffwechselwege für ausgewählte Kohlenhydrate unterschiedlicher Klassen – Aminozucker, Zuckeralkohol, Disaccharid, Hexose und Pentose – sowie zusätzliche Informationen der Genannotation von *P. inhibens* dar.

PM - Mono-, Di- und Polysaccharide

Das phänotypische MicroArray zeigt, wie in Abbildung 3.7 dargestellt, positive Ergebnisse für Respirationen in Abhängigkeit des genetischen Codes des großen 262 kb-Chromids (pPinh262kb) sowie des großen Chromids in Kombination mit dem kleinen 65 kb-Chromid (pPinh262kb_pPinh65kb). Das große Chromid scheint besondere Wichtigkeit für den Metabolismus der Saccharide zu haben, da hier eine Ausschließlichkeit der Ergebnisse vorliegt. Das kleine Chromid hat ebenfalls eine Bedeutung, jedoch nur in kombinatorischer Eigenschaft. Die Ergebnisse zu der Homologie in biologisch sinnvolle Klassen von Genen (COG), Abbildung 3.1 und dazugehörig Tabelle 3.1, ergibt dazu passend die Kategorien *M* Zellwand-/ Membran-/ Hüllenbiogenese als bedeutsam für das große Chromid aus.

Die 16 positiv getesteten Saccharide lassen sich größtenteils dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus zuordnen.

Die in Zusammenhang mit dem großen 262 kb-Chromid stehenden positiv getesteten Monosaccharide *a-D-Glucose* (pPinh262kb), *D-Xylose* (pPinh262kb), *Turanose* (pPinh262kb), *a-Methyl-D-Galactosid* (pPinh262kb), *D-Mannose* (pPinh262kb_pPinh65kb), *D-Fructose* (pPinh262kb_pPinh65kb), *N-Acetyl-D-Glucosamin* (pPinh262kb_pPinh65kb), *D-Galactose* (pPinh262kb_pPinh65kb),

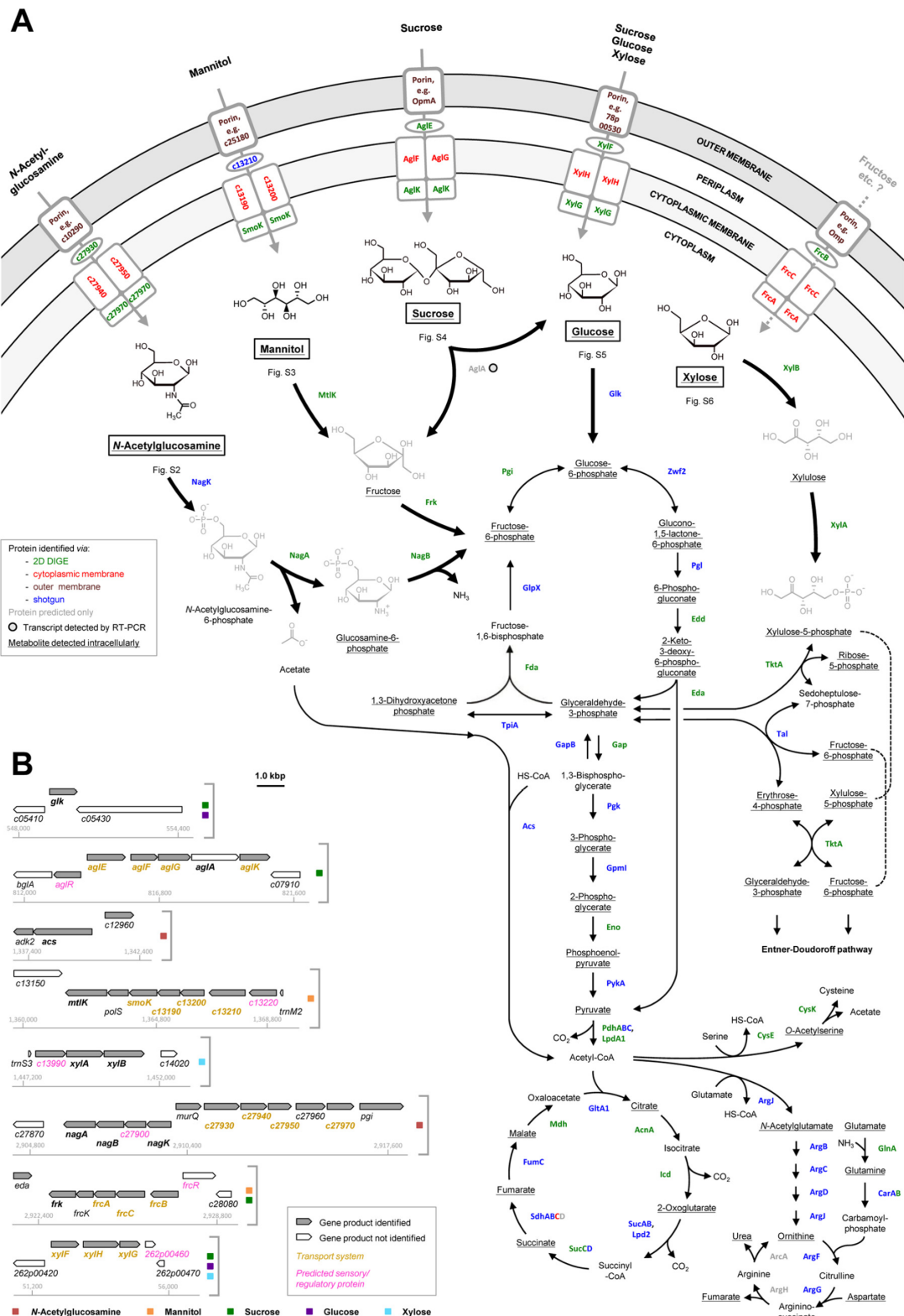


Abbildung 6.1: (A) Rekonstruktion der Transport- und Abbaustoffwechselwege für fünf ausgewählte Kohlenhydrate in *P. inhibens* DSM 17395. Zusätzliche Informationen der fünf ausgewählten Kohlenhydrate in (B), aus [WHW⁺14]

D-Ribose (pPinh262kb_pPinh65kb), *D-Fucose* (pPinh262kb_pPinh65kb) werden von *P. inhibens* DSM 17395 über den ED Stoffwechselweg metabolisiert. *D-Fucose* wird veratmet (positives PM-Ergebnis), jedoch nicht katabolisiert (negatives Ergebnis des Wachstumsversuchs). Zu *Turanose* und *α-Methyl-D-Galactosid* wurden keine Wachstumsversuche durchgeführt [BPG⁺13] und [WHW⁺14].

Die in Zusammenhang mit dem großen 262 kb-Chromid stehenden positiv getesteten Disaccharide *D-Maltose* (pPinh262kb), *Saccharose* (pPinh262kb), *D-Melibiose* (pPinh262kb_pPinh65kb), *Melibionsäure* (pPinh262kb), *D-Trehalose* (pPinh262kb_pPinh65kb) und dem Polysaccharid *D-Cellobiose* (pPinh262kb) werden ebenfalls von *P. inhibens* DSM 17395 über den ED Stoffwechselweg metabolisiert. Zu *D-Melibiose* und *Melibionsäure* wurden keine Wachstumsversuche durchgeführt [BPG⁺13] und [WHW⁺14].

Einige der Kernenzyme, die Bedeutung für die Transport- und Abbaustoffwechselwege der Saccharide in *P. inhibens* DSM 17395 haben, konnten nicht nur phänotypisch im Biolog-Experiment nachgewiesen werden, sondern ferner auch genotypisch als Kernenzyme auf den Chromiden gefunden werden, vergleiche Tabelle 4.1 und Tabelle 4.4. Dazu gehören *xylF*, *xylH* und *xylG*, die eine Rolle für den Import von beispielsweise *Saccharose*, *α-D-Glucose* (pPinh262kb) und *D-Xylose* spielen, sowie *alkJ*, *exoO*, *algA*, *fcl*, *gmd*, *aldose 1-epimerase*, die den COG-Kategorien *G* Kohlenhydratmetabolismus und -transport und *M* Zellwand-/ Membran-/ Hüllenbiogenese (relevant für die Biofilmbildung) angehören.

Die Kernenzyme *xylF*, *xylH* und *xylG* stechen analytisch durch ihre phänotypische und genotypische Relevanz für die Bedeutung des 262 kb-großen Chromids von *P. inhibens* DSM 17395 heraus. Das führt zu der Frage, wie *Xylose* bedeutsam für das Bakterium, in der marinen Umgebung vorliegt.

D-Xylose ist die hauptsächliche Monomereinheit von *Xylanen*, pflanzliche Heteropolysaccharide zu den Hemicellulosen gehörend. *Xylane* sind, nach *Cellose*, das häufigste Polysaccharid in der Natur. Als Monomere von Xylan kann nicht nur *D-Xylose*, sondern auch *D-Mannose*, *D-Glucose*, *D-Arabinose*, *D-Galactose*, *D-Glucuronsäure* und *D-Galacturonsäure* fungieren. [YO08] [Fre99]

Xylane, sowie *Cellulose*, oder als Abbauprodukt *Cellobiose*, kommen in Algen vor, was wiederum auf die Bedeutsamkeit des großen Chromids von *P. inhibens* DSM 17395 für die symbiotischen Aktivitäten, sowohl in mutualistischer wie auch in pathogener Form, mit Algen hervorhebt [SCKC11c]. Nicht nur die genetischen Informationen zur Aufnahme der Monomereinheiten der

Algen kodieren auf dem großen Chromid, auch die Fähigkeit zur Synthese von *Antibiotic Tropodithietic Acid* (TDA) und allen verwandten Zwischenprodukten [BBH⁺04] [GBN⁺08] [BBL⁺12] [DZB10] [BND14], die in das Absterben der Algenblüte involviert sind [SCKC11a], kodieren auf diesem Chromid.

PM - Alkohole

Für die Gruppe der Alkohole in den Kohlenstoffquellen des phänotypischen MicroArrays konnten sechs positive Ergebnisse detektiert werden, die sich auf die genetische Information des großen Chromids, *Glycerin*, und des großen Chromids in Kombination mit dem kleinen 65 kb-Chromid (pPinh262kb-pPinh65kb) zurück führen lassen. Hierbei handelt es um *D-Mannit*, *D-Sorbit*, *Ethanolamin*, *D-Arabitol* und *Myo-Inosit*. Wachstumsversuche haben gezeigt, dass mindestens *Glycerin*, *D-Mannit* und *D-Sorbit* von *P. inhibens* als Substratquelle zum Wachstum verwendet werden können [BPG⁺13] und [WHW⁺14]. *D-Mannit* ist ein Zuckeralkohol und leitet sich strukturell von *Mannose* ab. Er kommt in der Natur als D-Mannit in Salzpflanzen (Halophyten) und Algen vor [Fre99]. *Ethanolamin* wird als Zusatz in Reinigungsmitteln und Kosmetika (Fettsäure-Derivat für Detergenzien) verwendet [GESTIS-Stoffdatenbank]. *D-Sorbit* und *D-Arabitol* kommen in verschiedenen Obstsorten und im Splintholz von Laubbäumen vor [BGS08a]. *Myo-Inosit* kommt in Pilzen, Bakterien und manchen höheren Pflanzen vorwiegend in Faserform als *Phytinsäure* (*Inositolhexaphosphorsäure*) zur Phosphatspeicherung vor [War17].

PM - Carbonsäuren

Für die Substratquellen der Gruppe der Carbonsäuren des phänotypischen MicroArrays der Platten PM 01 und 02, konnten 18 positive Ergebnisse detektiert werden, die sich auf die genetische Information des großen 262 kb-Chromids (pPinh262kb) (nur *a-Oxobutansäure* und *a-Hydroxybutansäure*), sowie des großen Chromids in Kombination mit dem kleinen 65 kb-Chromid (pPinh262kb_pPinh65kb) zurück führen lassen. Hierbei handelt es um *b-Hydroxybutansäure*, *Brenztraubensäure*, *Methylpyruvat*, *L-Milchsäure*, *D-Äpfelsäure*, *L-Äpfelsäure*, *D,L-Äpfelsäure*, *Fumarsäure*, *D-Asparaginsäure*, *L-Asparaginsäure*, *Bernsteinsäure*, *Citronensäure*, *Ameisensäure*, *a-Keto-Valeriansäure*, *Propionsäure* und *Natriumformiat*.

Die Diskriminanzanalyse über den Wildtyp und die drei Chromid-Mutanten

lässt einen Rückschluss darauf zu, dass für die Carbonsäure *p-Hydroxy-Phenyllessigsäure* der relevante genetische Code für den Phänotyp ausschließlich auf dem 65 kb-großen Chromid von *P. inhibens* DSM 17395 liegt.

Ebenfalls für ein positives Ergebnis lässt sich auf die genetische Information des Chromosoms oder des 78 kb-großen Chromids zu; *Essigsäure* (Pinh-c-pPinh78kb) rückschließen.

Eine Sonderreaktion stellt die Carbonsäure *Buttersäure* dar, die im PM-Versuch ausschließlich ohne das 262 kb-Chromid als Kohlenstoffquelle verwendet wird.

Wachstumsversuche haben gezeigt, dass mindestens *Bernsteinsäure*, *Essigsäure* und *Buttersäure* von *P. inhibens* DSM 17395 als Substratquelle zum Wachstum verwendet werden können. *Citronensäure* und *L-Milchsäure* hingegen, werden nicht als Substratquelle zum Wachstum verwendet. [BPG⁺13] und [WHW⁺14]

Die insgesamt 20 positiv getesteten Carbonsäuren gehören, ausgehend von *Brenztraubensäure* unterschiedlichen Transport- und Abbaustoffwechselwegen von *P. inhibens* DSM 17395 an.

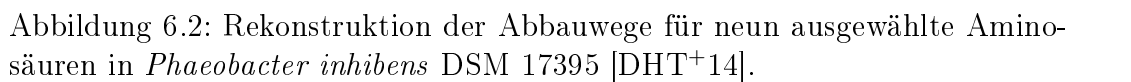
6.2.2 Transport- und Abbaustoffwechselwege – Citratzyklus

Dem Citratzyklus (TCA) dient dem Zweck der Energiegewinnung und der Bereitstellung von Zwischenprodukten für Biosynthesewege. Die im PM positiv getesteten Carbonsäuren *Citronensäure*, *Bernsteinsäure*, *Fumarsäure* und *D-Äpfelsäure*, *L-Äpfelsäure* sowie *D,L-Äpfelsäure* lassen sich dem TCA zuordnen.

Neben den getesteten Carbonsäuren werden, ausgehend vom TCA, auch Aminosäuren metabolisiert. Im p5hänotipischen MicroArray wurden zahlreiche Aminosäuren positiv getestet.

PM - Aminosäuren

Für die Gruppe der Aminosäuren in den Kohlenstoffquellen des phänotypischen MicroArrays konnten sieben positive Ergebnisse detektiert werden, die sich auf die genetische Information des großen Chromids (pPinh262kb) zurück führen lassen. Hierbei handelt es um *L-Asparagin*, *L-Valin*, *L-Leucin*, *g-Amino-Buttersäure*, *D,L-Carnitin*, *L-Methionin* und *L-Phenylalanin*.



Weitere 20 positive Ergebnisse lassen sich auf die genetische Information des großen Chromids in Kombination mit dem kleinen 65 kb-Chromid (pPinh262kb_pPinh65kb) zurück führen: *L-Serin*, *L-Glutaminsäure* und *L-Glutamin*, *L-Alanin* und *D-Alanin*, *L-Prolin*, *L-Threonin*, *Tyramin*, *L-Arginin*, *L-Lysin*, *Glycin*, *L-Isoleucin*, *4-Hydroxy-L-Prolin (trans)*, *L-Homoserin*, *L-Ornithin*, *N-Acetyl-L-Glutaminsäure*, *Glycyl-L-Asparaginsäure*, *L-Alanyl-Glycin*, *Glycyl-L-Prolin* und *Glycyl-L-Glutaminsäure*.

Ein positives Ergebnis lässt sich auf die genetische Information des Chromosoms oder des 78 kb-großen Chromids zurück führen; *L-Histidin* (Pinh-c-pPinh78kb).

Wachstumsversuche haben gezeigt, dass mindestens *L-Serin* und *L-Leucin* von *P. inhibens* als Substratquelle zum Wachstum verwendet werden können [BPG⁺13].

Eine Rekonstruktion der Abbauwege von neun ausgewählten Aminosäuren in *P. inhibens* DSM 17395 gibt die Abbildung 6.2. Alle ausgewählten Aminosäuren von [DHT⁺14] wurden im phänotypischen MicroArray positiv getestet. Die Ausnahme bildet hierbei ausschließlich *Tryptophan*. Diese Aminosäure wurde im PM nicht getestet.

6.2.3 Transport- und Abbaustoffwechselwege – Gärungs- und Verwesungsprozesse

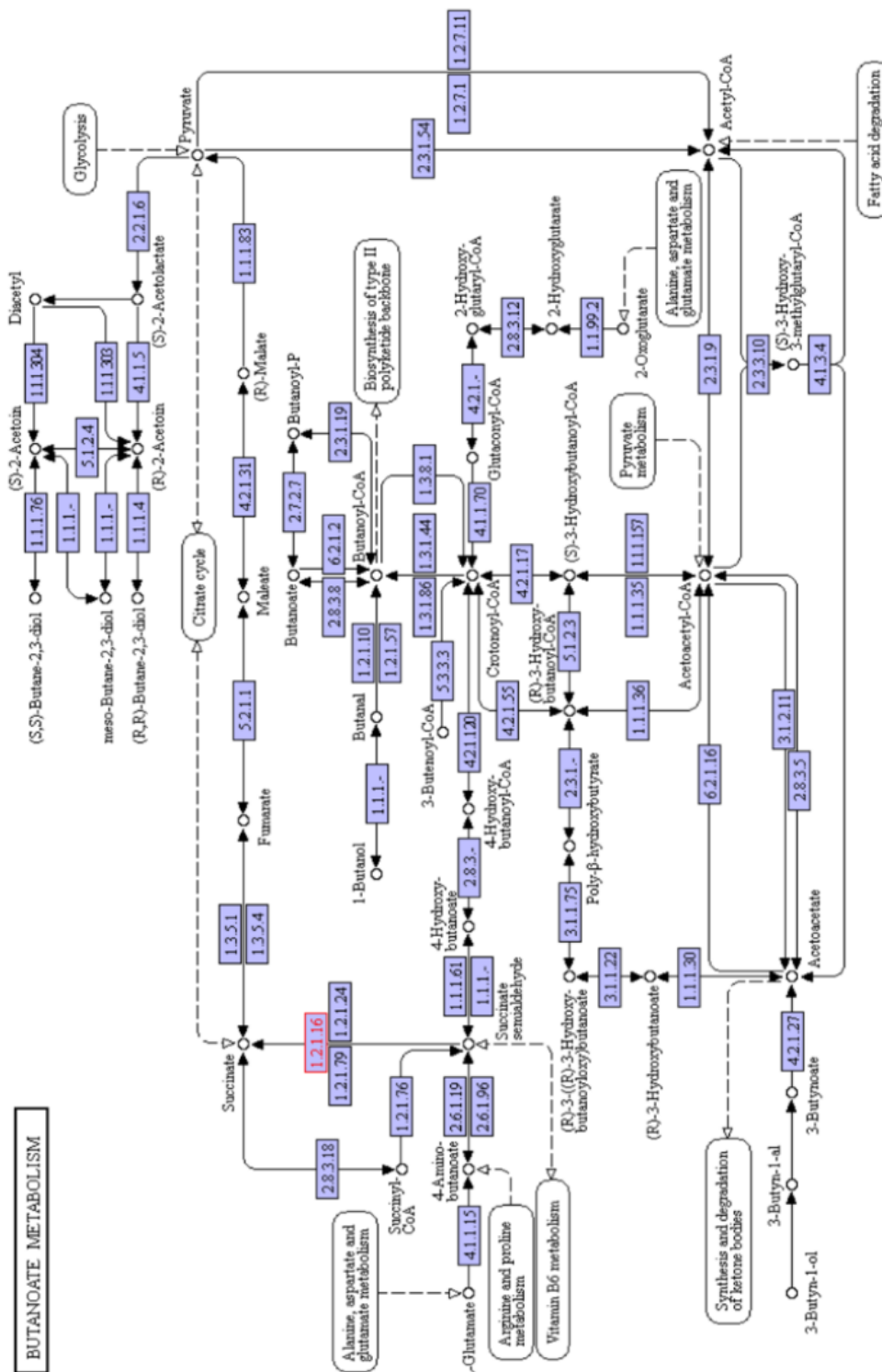
Einige der positiv getesteten Carbonsäuren und Aminosäuren lassen sich dem Gärungsprozess der Buttersäuregärung zuordnen.

Das positiv getestete Amin *Putrescin* lässt sich einem Verwesungsprozess zuordnen.

Buttersäuregärung

Die Buttersäuregärung, siehe Abbildung 6.3, unterliegt mehreren positiv getesteten Stoffwechselzwischenprodukten. Zusammengefasst entsteht aus Brenztraubensäure *Acetoacetyl-CoA*, woraus *beta-Hydroxybutyryl-CoA* und *Acetessigsäure* gebildet wird. Aus *beta-Hydroxybutyryl-CoA* bildet sich *Crotonyl-CoA* und daraus wiederum *Butyryl-CoA*, das zu *Buttersäure* oder *Butanal* und *Butanol* umgewandelt wird.

Der Stoffwechselweg der Carbonsäure *Buttersäure* scheint in *P. inhibens* DSM 17395 eine durch Genregulation gesteuerte Rolle zu spielen. Die Carbon-



00650 11/26/15
(c) Karelina Laboratories

Abbildung 6.3: Buttersäurestoffwechselweg mit dem rot gekennzeichnetem Enzym *Bernsteinsäure-Semialdehyd Dehydrogenase GabD* (PGA1_262p00540), das auf dem 262 kb großen extrachromosomalen Element kodiert und möglicherweise genregulatorische Eigenschaften besitzt. [KGS⁺14]

säure wird in Wachstumsversuchen katabolisiert [BPG⁺13], im PM-Experiment jedoch ergibt sie als Sonderreaktion, ausschließlich ohne das 262 kb-Chromid, ein positives Ergebnis. Das Enzym *Bernsteinsäure-Semialdehyd Dehydrogenase GabD* (PGA1_262p00540) kodiert auf dem 262 kb-großen extrachromosomalen Element und könnte eine Schlüsselfunktion einnehmen. Es katalysiert die chemische Reaktion:



Fehlt dieses Enzym, in Abbildung 6.3 rot gekennzeichnet (1.2.1.16), durch die Entfernung des gesamten 262 kb-Chromides, wird im PM Experiment *Buttersäure* stärker metabolisiert, als mit diesem Enzym. Der Metabolismus verlagert sich folglich zugunsten der Nutzung von *Buttersäure*. Eine genauere Rekonstruktion der Zusammenhänge des Buttersäurestoffwechselweges in *P. inhibens* DSM 17395 stellt ein aussichtsreiches Forschungsthema dar.

Die assoziierten Substrate *a-Keto-Buttersäure*, *a-Hydroxy-Buttersäure* und *a-Keto-Valeriansäure* ergeben im PM-Experiment ebenfalls positive Ergebnisse.

Im Buttersäurestoffwechselweg entsteht auch *Polyhydroxybuttersäure* (PHB) [ZTS⁺09], eine Speichersubstanz im Bakterium, die beispielsweise für Bioplastikmüllbeutel verwendet wird und vollständig biologisch abbaubar ist. [Tagungsbeitrag Youmares 0.3]

PM - Amine

Putrescin und *Cadaverin* sind faulig riechende Stoffe, die produziert werden, wenn Aminosäuren im Verwesungsprozess abgebaut werden. Die Stoffe lassen sich in geringen Konzentrationen auch in lebenden Zellen detektieren [HCS97]. *Putrescin* entsteht durch die Decarboxylierung von *Ornithin* und *Arginin*; *Cadaverin* durch die Decarboxylierung von *Lysin*. *Putrescin* als mögliches zu testendes Substrat der PM Platten 01 und 02 ergab ein positives Ergebnis mit dem Rückschluss auf in Zusammenhang stehenden genetischen Codes des großen 262 kb-Chromids. *Cadaverin* wurde bereits von [DHT⁺14] als Folgeprodukt von *Lysin* durch die chromosomal kodierte *Lysin/Ornithin Decarboxylase* beschrieben, siehe Abbildung 6.2. Da *Putrescin* ebenfalls durch dieses Enzym decarboxyliert werden könnte, würde dies das positive PM-Ergebnis, jedoch nicht den Rückschluss auf das große Chromid, erklären. Da jedoch das En-

Supplementary material S11 Proposed pathways for the degradation of osmolytes in *Phaeobacter gallaeciensis* and methionine biosynthesis.
Compounds in boxes were tested as carbon source in growth experiments with *P. gallaeciensis* DSM17395 and strain 2.10.
Given are protein name, gene name and EC number. Arrows with dashed lines indicate more than one reaction step between two intermediates.
Reactions for which no enzyme could be predicted from the genome are indicated by question marks.

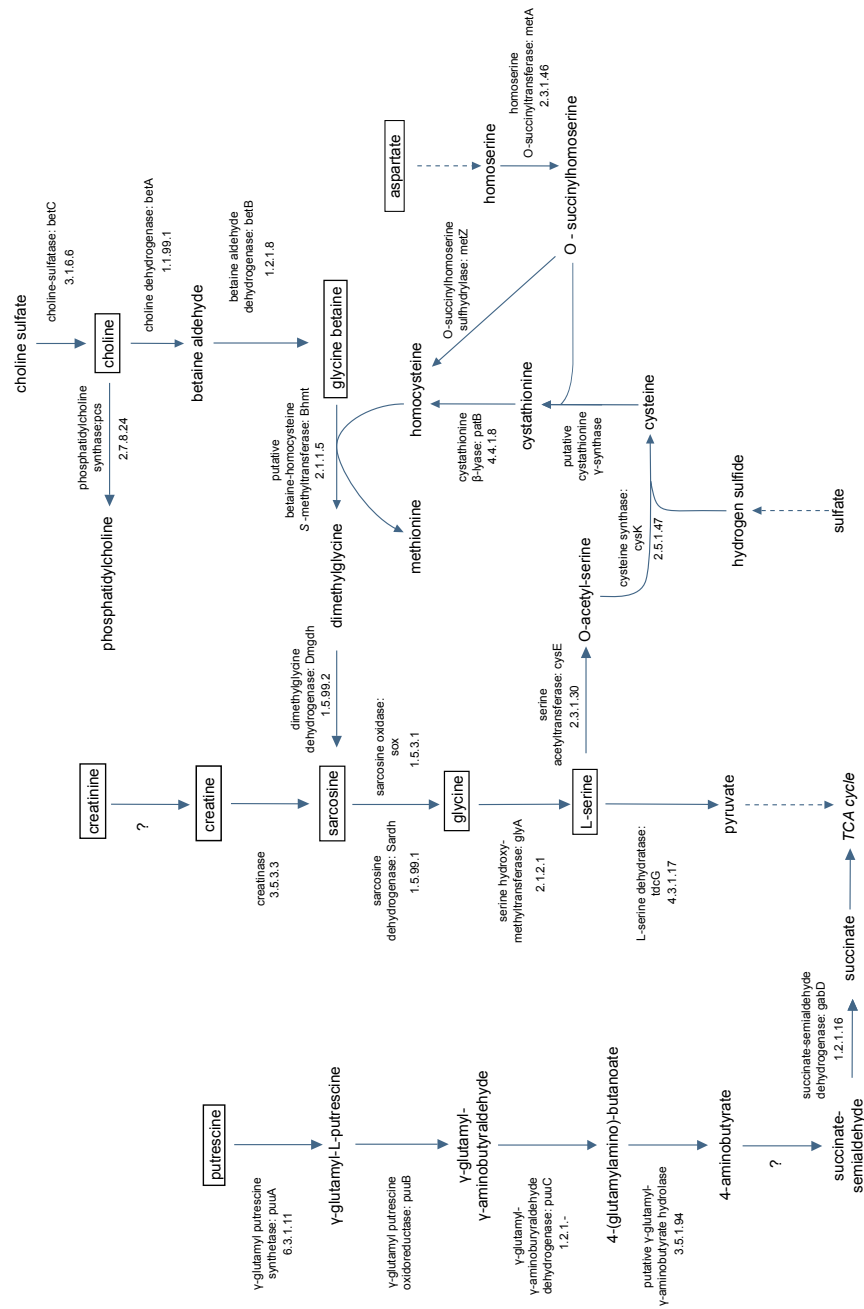


Abbildung 6.4: Abbau von Putrescin mittels Enzym *Bernsteinsäure-Semialdehyd Dehydrogenase GabD* (PGA1_262p00540), das auf dem 262 kb großen extrachromosomalen Element kodiert und offensichtlich genregulatorische Eigenschaften besitzt. [TKV⁺12]

zym *Bernsteinsäure-Semialdehyd Dehydrogenase GabD* (PGA1_262p00540) am Abbau von *Putrescin* beteiligt ist, siehe Abbildung 6.4, erklärt sich die PM-Reaktion.

6.2.4 Nukleinsäuren

Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger der Erbinformation besteht aus Desoxyribonukleotiden. Jedes Nukleotid hat drei Bestandteile: Phosphorsäure bzw. Phosphat, den Zucker Desoxyribose sowie eine heterozyklische Base: Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin. Die Gene in der DNA enthalten die Information für die Herstellung der Ribonukleinsäuren (RNA).

PM - Nukleoside

Nukleoside sind N-Glycoside heterozyklischer Stickstoffbasen. Besondere Bedeutung haben Verbindungen von Purin- und Pyrimidinbasen mit Pentosen. Nukleoside haben Trivialnamen, die sich vom Basenbestandteil ableiten lassen. Pyrimidinderivate erhalten die Endung -idin, Purinderivate die Endung -osin. Nukleoside und Desoxynucleoside können über den Wiederverwertungsweg synthetisiert werden. Sie entstammen ferner der Hydrolyse von Nukleinsäuren und Nukleotiden. Streng genommen bezeichnen Nukleoside Basen-Zucker-Kombinationen, wie sie in den Nukleinsäuren vorkommen. Der Begriff wird jedoch oft für jede Basen-Zucker-Verbindung verwendet. [Fre99]

Die vier Nukleoside *Thymidin*, *Adenosin*, *Uridin* und *Inosin*, die durch das phänotypische MicroArray getestet wurden, ergeben positive Ergebnisse mit dem Rückschluss zu der genetischen Information des Chromosoms (oder des 78 kb-großen Chromids). Dabei handelt es sich bei *Thymidin* um einen Baustein der DNA, bei *Adenosin*, *Uridin* und *Inosin* hingegen um Bausteine der RNA. *Thymidin* ist ein Nukleosid, aus der Nukleinbase *Thymin* und der Pentose *D-Desoxyribose*. *Adenosin* ist ein Nukleosid und besteht aus der Nukleinbase *Adenin* und dem Zucker *b-D-Ribose*. *Uridin* ist ein Nukleosid und besteht aus der Nukleinbase *Uracil* und dem Zucker *b-D-Ribose*. *Inosin* ist ein seltenes Nukleosid der RNA. Es besteht aus der *b-D-Ribofuranose* und dem *Hypoxanthin*, einer Base, die ein *Purin* als Grundgerüst hat, welches als Zwischenprodukt des Purinstoffwechsels entsteht.

Als Kernelemente der Erbinformation sind die positiven Ergebnisse dieser Kategorie mit Rückschluss auf das Chromosom, das im Gegensatz zu den Chro-

miden nicht aus dem Bakterium eliminiert werden kann, folgerichtig.

6.3 *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 und Chromidmutanten *Genotyp/Phänotyp* - Chemikaliertoleranz (PM10-PM20)

Die Analyse der Toleranz gegenüber 240 Chemikalien mittels der phänotypischen MicroArray Technologie wurde angewandt, um den Umfang der Toleranzen von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 und der drei Chromid-Mutanten zu ermitteln. Insgesamt wurden 164 unterschiedliche Substanzen von *P. inhibens* DSM 17395 toleriert. Des Weiteren konnte durch die Diskriminanzanalyse die Bedeutung der Chromide des Bakteriums für die Chemikaliertoleranzen detektiert werden. Die größte Bedeutung war bei der Kombination der genetischen Information des 262 kb-Chromids und des 65 kb-Chromids zu verzeichnen: 69 positive Reaktionen; gefolgt von dem großen 262 kb-Chromid allein mit 40 positiven Reaktionen. Die genetische Information des kleinen Chromids ergab 8 positive Ergebnisse und der genetische Code des Chromosoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids folgerte 26 positive Reaktionen. Ferner gab es 21 Sonderreaktionen. Folglich konnten insgesamt 117 positive PM-Ergebnisse auf die genetische Information des großen und/ oder des kleinen Chromids zurück geführt werden, was die Bedeutsamkeit der Chromide von *P. inhibens* DSM 17395 in Bezug auf die Toleranz gegenüber Chemikalien deutlich macht. Zur Charakterisierung des Genotyps wurden die Ergebnisse der Klassifizierung zu der Homologie in biologisch sinnvolle Klassen von Genen (COG), siehe Abbildung 3.1, sowie die Informationen aus den Datenbanken, aufgelistet in Abschnitt 2.9, zu Kernenzymen mit zugehörigen *Locus-Tags* und zugehörigen Stoffwechselwegen beziehungsweise Reaktionen, herangezogen. Neben zahlreichen Chromid-kodierten **Multidrogen- und Pheromontransportern**, siehe Tabelle 5.3 und Tabelle 5.4, kodieren auch Chromid-lokalisierte **Regulatoren**, siehe Tabelle 5.1, sowie **multiple Antibiotikaresistenz-Regulatoren**, siehe Tabelle 5.5 und Tabelle 5.6, im Genom von *P. inhibens* DSM 17395. Diese Genomsequenzen könnten maßgeblich an dem Toleranzverhalten des Meeresbakteriums gegenüber den zahlreichen Chemikalien verantwortlich sein. Zu den tolerierten Chemikalien gehören Substanzen der Klassen der **Biozide**, **Metabolite**, **Sekundärmetabolite**, **Aminosäuren** in Verbindung mit

dem **pH-Wert-Bereich**, **Aromaten**, **anorganische Substrate**, **halogenhaltige Substrate**, **Psychopharmaka**, **Antiseptika** und **Zytostatika** der Unterklassen **Alkylanzien**, **Antimetabolite** und **Antibiotika**.

6.3.1 PM - Biozide

Biozide sind Substanzen und Produkte, die Schädlinge wie Insekten oder Ratten sowie Algen, Pilze oder Bakterien bekämpfen. Sie können nach ihrem Zielorganismus eingeteilt werden: **Viruzide** gegen Viren, **Bakterizide** gegen Bakterien, **Endektozide** gegen Endo- und Ektoparasiten, **Pestizide** gegen Tiere und Pflanzen, die sich wiederum unterteilen lassen in: **Akarizide** gegen Milben, **Algizide** gegen Algen, **Fungizide** gegen Pilze, **Insektizide** gegen Insekten, **Mikrobizide** Ausrüstung gegen Keime, **Molluskizide** gegen Schnecken, **Nematizide** gegen Nematoden, **Rodentizide** gegen Nagetiere, **Avizide** gegen Vögel und **Piscizide** gegen Fische. [Psc02]

P. inhibens DSM 17395 zeigte eine Toleranz gegenüber elf Bioziden der Gruppen der *Bakterizide*, *Fungizide* und *Herbizide*, siehe Tabelle 5.12, Tabelle 5.23, Tabelle 5.29 und Tabelle 5.31.

Biozide werden weltweit täglich genutzt um Organismen zu kontrollieren, die schädlich für Menschen oder Tiere sind, oder auch Materialschäden hervorrufen, wie z.B. beim *Biofouling*. Sie können jedoch ein großes Risiko für Menschen, Tiere und die Umwelt darstellen [JOS⁺13]. In Anbetracht der weit verbreiteten Nutzung von Bioziden, wie z.B. von *Chlorhexidin*, gibt es noch nicht viele Erkenntnisse zu ihrer aquatischen Toxizität [GFF12]. Durch die weit verbreitete Kontamination von oberflächlichen oder unterirdischen Gewässern mit Pestiziden, durch beispielsweise die Agrarkultur, verschlechtert sich die Wasserqualität. Die Toxizität von Pestiziden und ihren Abbauprodukten bürden eine Gefahr für die Umwelt. Es gibt einige Prozesse zur Entfernung von Pestiziden aus Frisch- und Brackwasser: Biodegradation, Photodegradation (UV Radiation), Oxidation (mit Luft, *Chlorin*, *Permanganat* oder Ozon), Flokkulation und Filtration, Adsorption durch Aktivkohle oder Membrantechniken (reverse Osmose) gehören dazu. Die Effizienz ist meist gering. [KZSK95]

Bakterizide

Bakterizide sind chemische Substanzen, die die Fähigkeit besitzen Bakterien abzutöten. Messungen der *Bakterizide* dienen zur Beurteilung der Wirksamkeit

antibakterieller Substanzen. Antibiotika gelten als bakterizid wirksam, wenn sie in therapeutisch erreichbarer Konzentrationen Bakterien ihres Wirkungsspektrums abtöten. [Psc02]

P. inhibens DSM 17395 zeigte im phänotypischen MicroArray eine Toleranz gegenüber drei Bakteriziden. Für zwei Bakterizide war der genetische Code des größten 262 kb-Chromids relevant: *Hexachlorophen* und *Patulin*.

Hexachlorophen ist ein fast wasserunlösliches Phenolderivat mit stark bakterizider Wirkung. Es wirkt in hoher Konzentration haut-, schleimhautreizend und neurotoxisch. Die Verwendung als Desinfektionsmittel ist obsolet und der Einsatz in Kosmetika ist seit 1985 in Deutschland verboten. Das Bakterizid bildet im Rahmen der Herstellung oder Zersetzung *tetrachlorierte Dibenzo-p-dioxin* (TCDD). Eine Stoffgruppe von 22 Isomeren. Extrem toxisch und hoch persistent ist das 2,3,7,8-substituierte TCDD. Dies ist die giftigste bisher synthetisierte Substanz. Eine akute Toxizität tritt bereits im Nanogrammbereich auf. [Psc02] Reddy *et. al* berichten in ihrer Studie zu anthropogenen Stoffen in marinen Sedimenten und Frischwassersedimenten, dass mehr als 99% des totalen Anteils an *Hexachlorophen* in Sedimenten gebunden wurde [RQK00]. In neueren Studien wird das Bakterizid nicht erwähnt, was an dem Nutzungsverbot liegen könnte.

Patulin ist ein Mykotoxin, das in einigen Schimmelpilzarten, wie z.B. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssosclamyces*, *Paecilomyces variotii*, in vornehmlich angefaultem Kernobst gebildet wird, so auch in Äpfeln. Es ist ein Antibiotikum mit negativen gesundheitlichen Auswirkungen [MPZW05]. Da auch im marinen Umfeld *Penicillium*-Stämme auftreten, ist das Mykotoxin detektierbar [VKB⁺12]. Dong *et. al* berichten in ihrer Studie, dass *Patulin* von marinen Hefen abgebaut wird, [DJL⁺15]. Gegen *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa* ist *Patulin* jedoch wirksam [FJG13].

In einer Sonderreaktion zeigte *P. inhibens* DSM 17395 eine Toleranz gegenüber dem Biozid *Chlorhexidin* mit einem breiten antiseptischen Wirkungsspektrum. Es wird zur Desinfektion von Haut- und Schleimhäuten sowie zur Karies- und Parodontalprophylaxe verwendet [Psc02]. Diese Toleranz ist besonders vor dem Hintergrund der Studie von Guimaraes *et. al* bemerkenswert, die berichtet, dass *Chlorhexidin* für Bakterien in Konzentrationen von 1,55 mg pro Liter (*Klebsiella oxytoca*) und 0,32 mg pro Liter (*Escherichia coli*) inhibierend auf das Wachstum wirkt [GFF12].

Ebenfalls in einer Sonderreaktion im phänotypischen MicroArray zeigte

P. inhibens DSM 17395 eine Toleranz gegenüber *Triclosan*, das zur chemischen Stoffgruppe der *polychlorierten Phenoxyphenole* gehört, ist ein bakterienhemmender Wirkstoff, der in einer breiten Palette von Bedarfsgegenständen, kosmetischen Präparaten und Desinfektionsmitteln als Biozid und Konservierungsstoff eingesetzt wird. *Triclosan* wird vor allem in Arzt- und Zahnarztpraxen sowie in Krankenhäusern eingesetzt, um die Übertragung von Krankheitserregern zu verhindern. Zudem wird *Triclosan* in Kosmetikartikeln, wie zum Beispiel Zahnpasta, Deodorants und Seifen eingesetzt, ebenso in Haushaltsreinigern und Waschmitteln. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) rät vom Einsatz zur Desinfektion im Haushalt, z. B. in Reinigungsmitteln, ab, da durch die geringe Konzentration von *Triclosan* in den Reinigern eine Resistenzbildung von Bakterien zu befürchten ist, die durch Kreuzresistenz auch auf die Antibiotika *Doxycyclin* oder *Ciprofloxacin* übergreifen kann. [Bun06] Das Biozid *Triclosan* konnte im aquatischen Bereich in unterschiedlichen Organismen nachgewiesen werden [AEPPS02]. Für das Bakterizid wurden bisher keine toxischen Eigenschaften für *Mammalia* nachgewiesen. Für im Wasser lebende Organismen wie Fische und *Daphnia magna* und speziell für Algen ist *Triclosan* jedoch eine toxische Wirkung bekannt [Cib98].

Fungizide

Fungizide sind chemische oder biologische Wirkstoffe, die Pilze oder ihre Sporen abtöten oder ihr Wachstum für die Zeit der Wirksamkeit verhindert. Die Eigenschaft nennt man fungizid (pilzabtötend), den Vorgang Fungizidie. [SJW12]

P. inhibens DSM 17395 zeigte eine Toleranz gegenüber der Fungizide *Dodin*, *Pentachlorophenol*, *2-Phenylphenol*, *Blasticidin S* und *Oxycarboxin*. Der genetische Code für die Toleranz gegen *Dodin* lässt auf das große 262 kb-Chromid schließen, wobei sich die Toleranz gegen *Pentachlorophenol* auf die genetische Information der Kombination des 65 kb- mit dem 262 kb-großen Chromids zurück führen lassen. Der genetische Code des Chromsoms und/oder des 78 kb-großen Chromids war maßgeblich für die Toleranz gegenüber *2-Phenylphenol*. Die Toleranz gegenüber *Blasticidin S* und *Oxycarboxin* wurde durch eine Sonderreaktion detektiert.

Dodin ist ein 1957 auf den Markt gebrachtes Fungizid [BPS82], welches auch eine geringe kurative Wirkung besitzt [Ung96]. Kouras *et. al* untersuchten in Ihrer Studie die Effizienz der Entfernung von Pestiziden aus Gewässern;

im ersten Teil von *Dodin*. Die Effizienz ihrer kombinierten physio-chemischen Prozesse war nicht größer als 15% [KZSK95].

Die Toxizität von *Pentachlorophenol* gegenüber aquatischen Organismen wurde in der Studie von Hedtke *et. al* unter Laborbedingungen belegt [HWA⁺86]. Eine Toleranz des in dieser Studie untersuchten Meeresbakteriums gegen das Fungizid, lässt ebenfalls Vermutungen zu relevanten Konzentrationen von *Pentachlorophenol* in marinen Umgebungen zu.

2-Phenylphenol kann aus Zitronen extrahiert werden Es handelt sich um ein Fungizid und Konservierungsmittel, das bei der Lagerung als Imprägnierung von Äpfeln, Steinobst, Zitrusfrüchten, Tomaten, Gurken und Paprika genutzt wird, um Krankheiten zu verhindern. Es gehört zur Familie der Biphenyle und Derivate. [Pub Chem]

Blasticidin S ist ein Nukleosid-Antibiotikum und Fungizid aus *Streptomyces griseochromogenes* aus der Gruppe der Aminoacylnukleoside [SSJB13]. Gaw *et. al* fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass zahlreiche Antibiotika in marinen Umgebungen nachweisbar sind [GTH14]. So lässt sich die Toleranz von *P. inhibens* DSM 17395 gegenüber *Blasticidin S* erklären.

Oxycarboxin kann aus *Carboxin* durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid dargestellt werden. DellaGreca *et. al* evaluierten in ihrer Studie die ökotoxikologischen Effekte von *Carboxin* auf aquatische Organismen, die nicht den Zielorganismus des Fungizids darstellen [DIC⁺04]. Diese Untersuchung legt die Vermutung nahe, dass in marinen Gewässern Konzentrationen von *Oxycarboxin* auftreten, die zu einer Toleranzentwicklung von *P. inhibens* DSM 17395 geführt haben.

Herbizide

Herbizide sind eine chemisch heterogene Substanzgruppe zur Unkrautbekämpfung bzw. militärischer Anwendung als sogenannte Entlaubungsmittel. Medizinisch relevant sind insbesondere chlorierte *Phenoxy-carbonsäuren* und *Bispyridium*-Verbindungen. Schwere akute und chronische Vergiftungen sind beschrieben, eine spezifische Therapie bzw. Antidote sind nicht bekannt. [Psc02]

P. inhibens DSM 17395 zeigte im phänotypischen MicroArray eine Toleranz gegenüber zwei Herbiziden. Für die Toleranz gegen das Herbizid *3-Amino-1,2,4-triazol* (*Amitrol*) war der genetische Code des großen 262 kb-Chromids in Kombination mit dem kleinen 65 kb-Chromid verantwortlich. *Amitrol* wird

insbesondere gegen breitblättrige Unkräuter eingesetzt. Nach der Behandlung bleichen die Chlorophylle in den Pflanzen aus. Während man von der Hemmung der *Histidin*-Biosynthese ausging [HKA65], ist heutiger der Stand der Forschung die Hemmung von *Lycopin*-Cyclasen in der *Carotinoid*-Biosynthese [MLWL99]. Auch für Algen ist das Herbizid toxisch [MW75].

Für die Toleranz gegen das Herbizid *Methyl-Viologen* (*Paraquat*) war der genetische Code des Chromosoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids verantwortlich. *Paraquat* ist eine quartäre Ammoniumverbindung aus der Familie der *Bipyridin*-Herbizide, die als Kontaktherbizide eingesetzt werden. *Paraquat* wurde von der englischen Firma Imperial-Chemical-Industries (deren Agrarsparte heute Teil der Schweizer Syngenta ist) 1955 entwickelt und kam 1962 erstmals unter dem Handelsnamen *Gramoxone* auf den Markt [EHEI⁺93]. *Paraquat* wird durch Pflanzenoberflächen absorbiert. In den *Chloroplasten* werden Elektronen vom Photosystem I auf das *Paraquat*-Kation übertragen, das dadurch zum *Paraquat*-Radikal wird. Das Radikal gibt sein überschüssiges Elektron an ein Sauerstoffmolekül ab, es entsteht Hyperoxid. Somit zerstört es ungesättigte Fettsäuren in den Chloroplasten- und Zellmembranen. Da das Kation durch Elektronen immer wieder zum Radikal reduziert wird, setzt sich dieser Vorgang fort, bis das Photosystem zerstört ist. Die Zellmembran wird porös und es kommt zu Wasserverlust. Die Pflanzen vertrocknen bei sonnigem Wetter innerhalb weniger Stunden. [Sun02] *Phytoplankton* reagiert sensitiv auf das Herbizid, das auch in marinem Umfeld detektierbar war [BCB98]. 1985 gab es in Japan sogar eine Mordserie, bei der Getränkedosen mit *Paraquat* präpariert waren. Der Täter wurde nie gefasst [<http://www.nytimes.com/1985/12/10/world/japanese-puzzle-the-vending-machine-murders.html>].

6.3.2 PM - Metabolite

Metaboliten synonym *Stoffwechselzwischenprodukte* sind die Produkte aus enzymkatalysierten Reaktionen, die natürlicherweise in Zellen vorkommen. Um als Metabolit eingestuft zu werden, muss eine Verbindung folgende Kriterien erfüllen [Alb07]:

1. Die Metaboliten sind chemische Verbindungen, die sich innerhalb von Zellen befinden.
2. Metaboliten entstehen durch den Einfluss von Enzymen.

3. Metaboliten müssen in der Lage sein, in Folgereaktionen einzutreten.
4. Die Metaboliten haben eine begrenzte Halbwertszeit; sie reichern sich nicht in Zellen an.
5. Viele Metaboliten sind Regulatoren, die die Einzelschritte des Stoffwechsels steuern.
6. Metaboliten müssen nützliche biologische Funktionen in der Zelle erfüllen.

Der Stoffwechsel (auch Metabolismus) besteht aus vielen einzelnen Serien enzymatischer Umsetzungen, die spezifische Produkte liefern. Diese Zwischenprodukte (jedem Reaktionsschritt kommen mindestens ein Substrat sowie mindestens ein Produkt zu) werden als Metaboliten bezeichnet. Die Gesamtheit der Metaboliten einer Zelle zu einem definierten Zeitpunkt wird als Metabolom bezeichnet.

Als Sonderreaktionen wurden für *P. inhibens* DSM 17395 zwei Stoffwechselzwischenprodukte, *Pyrophosphat* und *D,L-a-Liponsäure*, positiv getestet, gegen die sich das Meeresbakterium tolerant verhält, siehe Tabelle 5.32.

Pyrophosphorsäure entsteht durch Erhitzen von *Phosphorsäure* auf ca. 250 Grad Celsius; biogene Bildung als *Pyrophosphat* (Abk. PP_i) bei Spaltung energiereicher Nukleotide (z.B. ATP; vgl. Phosphorylierung); sofortige Hydrolyse in zwei Moleküle (Ortho-)Phosphat.

Liponsäure ist ein Coenzym bei oxidativer Decarboxylierung von Alpha-ketosäuren und Bestandteil des Pyruvatdehydrogenase Komplexes in den Mitochondrien in fast allen Eukaryoten. Eine therapeutische Verwendung findet es in der Anwendung bei (diabetischer) Polyneuropathie. [Psc02]

Sowohl *Pyrophosphat* als auch die *Liponsäure* treten als Antioxidantien auf, chemische Verbindungen, die eine Oxidation anderer Substanzen verlangsamt oder gänzlich verhindert und eine große physiologische Bedeutung durch ihre Wirkung als Radikalfänger haben [Mah69]. Sie inaktivieren im Organismus reaktive Sauerstoffspezies (ROS), deren übermäßiges Vorkommen zu oxidativem Stress führt. Oxidativer Stress wird in Zusammenhang gebracht mit dem Alterungsprozess und der Entstehung einer Reihe von Krankheiten [VPS⁺03].

Als solches findet die *Liponsäure* Anwendung als therapeutisches Agens. So fütterten Monserrat *et. al* [MLF⁺08] in ihrer Studie dem Fisch *Corydoras paleatus* (*Callychthyidae*) *Liponsäure* zu und verzeichneten höhere Konzentrationen des Metabolits im sezierten Fisch. Gegebenenfalls kommt es durch derartige Zufütterungen in marinen Aquakulturen zu Konzentrationen dieses Stoffwechselzwischenprodukts, gegen die Meeresbakterien wie *P. inhibens*

DSM 17395 eine Toleranz entwickeln.

6.3.3 PM - Sekundärmetabolite

Der Sekundärstoffwechsel von Pflanzen bildet als nicht unmittelbar lebensnotwendige Stoffwechselprodukte *sekundäre Pflanzenstoffe*. Diese *Sekundärmetabolite* gehören nicht zur Grundausrüstung der Organismen und treten deshalb nur in einzelnen Pflanzengruppen auf. Es kann sich um bloße Abfallprodukte handeln, vielfach haben sie jedoch eine Funktion als Farbstoffe, Lockstoffe, als Abwehr gegen Fraßfeinde etc. Ihr Auftreten ist oft an taxonomisch umgrenzte Sippen gebunden, ihre Untersuchung ist daher für die Chemotaxonomie wichtig. Zu den sekundären Pflanzenstoffen gehören unter anderem Alkaloide, Flavonoide, ätherische Öle und Glykoside. Zuweilen werden auch die Fette hierzu gerechnet [Wag03].

Phaeobacter inhibens DSM 17395 zeigte sich gegen *Sekundärmetabolite* der Gruppe der *Alkaloide* (sieben Substanzen), der *Flavonoide* (eine Substanz) der *Lignane* (eine Substanz), der *Carbonsäuren* (eine Substanz) und der *Naphtochinone* (zwei Substanzen) tolerant, siehe Tabelle 5.7, Tabelle 5.14, Tabelle 5.16, Tabelle 5.26, Tabelle 5.30.

Alkaloide

Alkaloide sind eine Gruppe überwiegend aus Pflanzen stammender stickstoffhaltiger, basisch reagierender Substanzen. *Alkaloide* im engeren Sinne enthalten heterozyklisch gebundenen Stickstoff, der aus Aminosäuren stammt. Sie haben gewöhnlich starke physiologische Wirkungen oder sind toxisch für andere Organismen. Sie treten gehäuft in einigen Familien oder Ordnungen auf, z.B. bei den *Amaryllidaceae*, *Solanaceae*, *Papaverales* und *Gentianales*. [Wag03] Das Meeresbakterium *P. inhibens* DSM 17395 zeigte eine Toleranz gegenüber sieben unterschiedlichen *Alkaloiden*. Das vielleicht bekannteste *Alkaloid* ist das – in Kaffee, Tee oder Kakao – enthaltene *Koffein*.

Zurückführbar auf den genetischen Code des großen 262 kb- s des Bakteriums, ist die Toleranz gegenüber *Koffein*, sowie *Atropin* und *4-Hydroxycumarin*. Das größte und das kleinste Chromid in Kombination führten zu einer Toleranz gegenüber *Chelerythrin* und *Sanguinarin*. Sogar zwei Sonderreaktionen führten zu einer Toleranz gegenüber *Harman* und *Cumarin*.

Koffein wirkt in Pflanzen, die dieses Alkaloid enthalten, als Insektizid, indem es bestimmte Insekten betäubt oder tötet [FUDB86]. Auch im Ozean wurde *Koffein* als meeresverschmutzende Substanz bereits mehrfach an unterschiedlichen Orten detektiert [RGS12] [KGBP10]. *Atropin* ist ein *Alkaloid*, das hauptsächlich in der Familie der *Solanaceae* vorkommt. Sein Name leitet sich von *Atropa belladonna* ab. *Atropin* gehört zu den *Parasympatholytika*. *Atropin* hemmt die Wirkung des Parasympathikus und erregt in großen Gaben den Sympathikus. Auf das Zentralnervensystem wirkt Atropin zuerst erregend, dann lähmend [Fre99]. *4-Hydroxycumarine* gleich *Vitamin-K-Antagonisten* werden in der Medizin vom *4-Hydroxycumarin* abgeleitete Substanzen mit blutgerinnungshemmender Wirkung genannt [Psc02]. Die Toleranz von *P. inhibens* DSM 17395 weitet sich zudem auf das Derivat von *4-Hydroxycumarin*, das *Cumarin* aus, das auch als Schädlingsbekämpfungsmittel verwendet wird.

Chelerythrin und *Sanguinarin* als *Isochinolin-Alkaloide* aus dem Schöllkraut *Chelidonium majus* zugehörig der Familie der *Papaveraceae*, auch isolierbar aus Pflanzen der Familien der *Rutaceae* und *Fumariaceae* gehören durch ihre antibakterielle Wirkung zu den natürlichen Bakteriziden, die in der Zahnmedizin Anwendung finden [CEOO05].

Harmane befindet sich als heterozyklisches Amin, ebenso wie *Koffein*, in Kaffee oder Zigarettenrauch, sowie in gekochtem Fleisch [HC06]. *Harman* ist ein Neurotoxin [CUG⁺13].

Koffein wurde im Zusammenhang mit landwirtschaftlichen Pestiziden als meeresverschmutzendes Alkaloid detektiert [KGBP10]. Die sechs Alkaloide, gegen die das Meeresbakterium *P. inhibens* DSM 17395 in dieser Studie als tolerant nachgewiesen wurde, könnten ebenfalls in diesem Zusammenhang in den Ozeanen vorhanden sein.

Flavonoide

Flavonoide sind eine Gruppe von sekundären Pflanzenstoffen, die sich vom *Flavan*, einer Verbindung mit zwei aromatischen Ringen und einem sauerstoffhaltigen Heterozyklus, herleiten. Sie sind bei den *Angiospermen* weit verbreitet, fehlen aber den Algen Pilzen und Moosen [Wag03]. Der genetische Code des Chromosoms oder des 78 kb-großen Chromids sind für die Toleranz gegenüber des *Flavonoids*, genauer des *Flavonols Myricetin* nachweisbar. Marine

Öle, die im Fleisch von fettigem Fisch, der Leber von magerem Fisch und Speck von marinen Säugern enthalten sind, können mit *Myricetin* stabilisiert werden [WS98]. Das weitergehende Vorkommen in marinen Umgebungen ist unklar.

Lignane

Die *Lignane* sind eine Gruppe von pflanzlichen Naturstoffen, die sich von der *Zimtsäure* und ihren Derivaten ableiten und biochemisch zum *Phenylalaninstoffwechsel* gehören. Sie lassen sich in fünf große Subgruppen einteilen, und ihre derzeitige Nomenklatur ist weder zwischen diesen Gruppen noch innerhalb einer von ihnen konsistent. Viele Lignane sind physiologisch aktiv, z.B. die tumorhemmenden *Podophyllotoxine*. Dabei wechselwirken sie auf zwei unterschiedliche Arten mit der Zellteilung bei Tieren und auch beim Menschen. In der traditionellen chinesischen Medizin werden Lignane zur Behandlung von Hepatitis oder als Leberschutz verwendet. Einige Lignane unterdrücken Funktionen des Zentralnervensystems und inhibieren die *cAMP-Phosphodiesterase*, während andere als Fischgifte oder Keimungshemmer fungieren. [Sch05] *P. inhibens* DSM 17395 zeigte eine Toleranz gegenüber *Nordihydroguaiarsäure* (*NDGA*), einem sekundären Pflanzenstoff zugehörig den *Lignan*en. Die Reaktion ließ sich auf die Bedeutsamkeit des 65 kb-großen Chromids zurück führen. *NDGA* als Sekundärmetabolit ist in den Blättern des Kreosotbusches (*Larrea tridentata*), sowie in vielen Pflanzenharzen nachweisbar. Nachdem die Anwendung von Kreosotbuschzubereitungen in Verbindung mit Leber- und Nierenschäden gebracht wurden, wurde die Verwendung von *NDGA* als Lebensmittelzusatzstoff (Antioxidans) in vielen Ländern stark eingeschränkt [SSHS01]. Diese Studie zeigt, dass zumindest dieses spezielle Lignan vom Meeresbakterium *P. inhibens* DSM 17395 toleriert wird, so dass eine Annahme zu einer möglichen Toleranz gegenüber Fischgiften der Gruppe der *Lignane* begründet scheint.

Carbonsäuren

Sekundärmetaboliten leiten sich von Produkten des anabolen und katabolen Stoffwechsels ab, hauptsächlich von *Carbonsäuren*, Kohlenhydraten und Aminosäuren.

Als Sekundärmetabolit abgeleitet von den *Carbonsäuren*, genauer *Pyridincarbonsäuren*, die in der Chemie eine Stoffgruppe von organischen Ver-

bindungen bilden, die zu den Heterozyklen (genauer: Heteroaromaten) zählt, ist *Fusarinsäure* ein *Picolinsäure*-Derivat, das als Sekundärmetabolit einiger der pflanzenschädigenden Schimmelpilze der Gattung *Fusarium* gebildet wird [BPNL96]. *Fusarinsäure* hat herbizide, insektizide und antibakterielle Wirkungen. Es ist für Pflanzen ein Welketoxin (verursacht vorzeitiges Welken), auf den tierischen Organismus wirkt es aber nur schwach toxisch [DLW⁺12].

Die Toleranz *P. inhibens* DSM 17395 gegenüber *Fusarinsäure* lässt sich auf die Bedeutsamkeit des Chromosoms und/ oder 78 kb-großen Chromids zurück führen.

Manning evaluiert kontaminiertes Fischfutter auf Getreidebasis als Verursacher von Mykotoxinen der Gattung *Fusarium* in vornehmlich Warmwasserregionen. Der Sekundärmetabolit wirkt toxisch auf die untersuchten Fischarten. [WL01] Die Toleranz von *P. inhibens* DSM 17395 gegen das Mykotoxin deutet auf ein Vorkommen in marinen Umgebungen hin, das ebenfalls auf kontaminiertes Fischfutter zurück zu führen sein könnte.

Napthochinone

Napthochinone sind eine Gruppe von Oxidationsprodukten des Naphthalins. *1,4-Napthochinon* ist der Grundkörper vieler Naturstoffe, z.B. *Alkannin* (Alkanna), *Juglon*, *Vitamin K* (Phyllochinon), *Lawson* (Henna), *Lomatiol* und *Plumbagin* (Bleiwurz). *Napthochinone* werden vielfach als Ausgangsverbindungen für chemische Synthesen verwendet. *Napthochinone* kommen in vielen Spezies der Familien der *Bignoniaceae*, *Droseraceae*, *Plumbaginaceae*, *Boraginaceae*, *Juglandaceae*, sowie in kleinen Pflanzenfamilien wie den *Dioncophyllaceae* oder *Acanthaceae* vor. Diese Sekundärmetabolite haben ein interessantes Spektrum der biologischen Wirkungsweisen, wie zum Beispiel antibiotische, antivirale, entzündungshemmende, fiebersenkende, wachstumshemmende oder zytotoxische Effekte. Besonders in der asiatischen und südamerikanischen Volksmedizin werden Pflanzen mit diesen sekundären Metaboliten deshalb seit hunderten von Jahren genutzt. [BAHK09]

Im phänotypischen MicroArray zeigte *P. inhibens* DSM 17395 eine Toleranz gegenüber *Plumbagin*, die auf dem genetischen Code aus der Kombination des großen 262 kb- und des kleinen 65 kb-Chromids zurückzuführen ist. Die Toleranz gegenüber dem *Napthochinon Lawson* lässt sich auf die genetische Information des Chromosoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids zurückführen.

Über 600 perenylierte, also posttranslational modifizierte, *Chinone*, *Toluchinone*, *Toluhydrochinone* und *Naphtochinone*, häufig bezeichnet als *Meroterpene* ausgehend von ihrem Polyketid- oder Isoprenoid-biosynthetischem Ursprung, wurden im Zeitraum von 1972 bis 2011 von marinen Organismen isoliert. Etwa ein Drittel dieser Metabolite wurden als zytotoxisch eingestuft oder besaßen antioxidative Eigenschaften. [SDC12] Die Klasse der *Naphtochinone* ist folglich ubiquitär in marinen Umgebungen.

Plumbagin ist ein Naphtochinon, das nach dem Pflanzengenus *Plumbago* benannt wurde, aus dem es erstmalig isoliert wurde [PFK05]. Es ist ein Sekundärmetabolit der hauptsächlich in den Pflanzenfamilien *Plumbaginaceae*, *Droseraceae* und *Ebenaceae* vorkommt. Neben den biologischen Eigenschaften, die [BAHK09] *et. al* für die Klasse der *Naphtochinone* bereits gelistet haben, zeigen neuere Forschungen dass diese Wirkungsweisen häufig durch die Möglichkeit des Redoxcyclings oder der Chelatierung von Spurenmetallen in biologischen Systemen entstehen. Plumbagin ist in der Lage den Drogen-Efflux-Mechanismus in drogenresistenten Bakterien zu inhibieren. Außerdem wurde als interessante Bioaktivität dieses Sekundärstoffs die Fähigkeit gefunden, konjugative multidrogenresistente Plasmide zu eliminieren. [PDY⁺12]

Lawson, oder *2-Hydroxy-1,4-Naphtochinone*, oder Henna-Farbstoff, ist einer der simpelsten natürlich vorkommenden *Naphtochinone*. Dieses rot-orange Pigment, kann aus den getrockneten und pulverisierten Blättern der Henna-Pflanze *Lawsonia spp.*, Familie der *Lythraceae* extrahiert werden. Die gängigsten Spezies sind *Lawsonia alba*, *Lawsonia spinosa* und *Lawsonia inermis* Linn., die 0,5-1,5% *Lawson* enthalten. Über die Anwendung als Haarfärbemittel und als Färbemittel für die Haut besteht auf Grund der toxischen Wirkung und den biologischen Effekten eine kontroverse Diskussion. Als Metabolit zur weiteren organischen Synthese beginnt für *Lawson* eine neue Anwendung, die sich auf die biologischen Aktivitäten stützt. [JVP⁺15]

6.3.4 PM - Aminosäuren und pH-Wert Bereich

Unter den Substanzen, die als Chemikalien die im phänotypischen MicroArray in den Platten PM 10-20 getestet werden können, befinden sich auch einige Aminosäuren, die zum Teil mit unterschiedlichen pH-Werten getestet werden. Bei elf Aminosäuren gab es für *P. inhibens* DSM 17395 positive Reaktionen, siehe Tabelle 5.16, Tabelle 5.26 und Tabelle 5.30.

Neben der Aminosäure *Glycin*, die auch schon in den phänotypischen Tests der Kohlenstoffquellen positiv getestet wurde, siehe Tabelle 4.7, gab es bei drei weiteren Aminosäuren *D,L-Serin Hydroxamat*, *b-Chloro-L-Alanin* und *L-Glutaminsäure g-Hydroxamat* eine positive Reaktion. Diese drei Aminosäuren sind nicht als Substrate unter den Kohlenstoffquellen der Platten PM 01 und PM 02 anzufinden. Die Ergebnisse lassen sich auf die genetische Information des großen Chromids in Kombination mit dem kleinen 65 kb-Chromid (pPinh262kb_pPinh65kb) zurückführen. Bei der positiv getesteten Aminosäure *Poly-L-Lysin* lag eine Sonderreaktion vor.

Des Weiteren konnte der genetische Code des Chromosoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids für die positiven Reaktionen gegenüber sechs weiteren Aminosäuren *L-Glutamin*, *L-Alanin*, *L-Asparagin*, *L-Threonin*, *4-Hydroxy-L-Prolin [trans]* und *Hydroxy-L-Prolin* identifiziert werden, die bei einem pH-Wert von 9,5 positiv getestet wurden. Im sauren pH-Wert Bereich wurde *P. inhibens* DSM 17395 *negativ* getestet. Positive Reaktionen konnten ab einem pH-Wert von größer oder gleich 7 detektiert werden.

Alle Aminosäuren, bis auf *Hydroxy-L-Prolin*, wurden ebenfalls in PM 01 bzw. PM 02 getestet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Platten zu den Kohlenstoffquellen, die für *L-Glutamin*, *L-Alanin*, *L-Threonin* und *4-Hydroxy-L-Prolin [trans]* eine positive Reaktion mit dem Rückschluss auf den genetischen Code des großen Chromids in Kombination mit dem kleinen 65 kb-Chromid (pPinh262kb_pPinh65kb) zurückzuführen sind und im Fall von *L-Asparagin* auf den genetischen Code des großen 262 kb-Chromids, können die positiven Reaktionen der Aminosäuren im alkalischen pH-Wert Bereich auf den genetischen Code des Chromosoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids zurückgeführt werden. Eine auffällige Veränderung der Bedeutung der Chromide in unterschiedlichem pH-Wert Millieu. Die Bedeutung von extrachromosomalen Elementen für die Regulation der pH-Sensorik wurde unter anderem von Li *et al.* [LJH⁺02] in ihrer Studie zu *Agrobacterium tumefaciens* beschrieben.

6.3.5 PM - Aromaten

Nach Stanger [Sta09] gibt es für *Aromaten*, eine Stoffklasse der organischen Chemie, drei prinzipielle Eigenschaften die als Kriterien genutzt werden können: **a)** strukturgebende, **b)** energetische und **c)** magnetische. Die drei Kriterien stammen von den Eigenschaften *Benzens* und Hückels Betrachtung davon.

Das Problem einer Definition und Quantifizierung von aromatischen Verbindungen ist die fehlende *aromatische Einheit*. Da es keinen Konsens darüber gibt, welche der Kriterien aromatische Verbindungen messen können, ist die Quantifizierung schwierig. Ursprünglich stammt ihr Name von dem aromatischen Geruch der zuerst entdeckten Verbindungen dieser Stoffklasse.

Im phänotypischen MicroArray zeigte *P. inhibens* DSM 17395 eine Toleranz gegenüber vier verschiedenen Aromaten. Dabei lassen sich die Toleranzen gegenüber *1,10-Phenanthrolin* und *3,5-Dinitrobenzoesäure* auf die genetische Information des 262 kb-großen Chromids zurückführen, siehe Tabelle 5.7, wohingegen für *1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen* und *2,4-Dinitrophenol* der genetische Code aus der Kombination des großen 262 kb- und des kleinen 65 kb-Chromids relevant sind, siehe Tabelle 5.16.

Polyzyklische Aromaten kommen in den meisten urbanen Küstenregionen der Welt vor. Sie akkumulieren im Sediment und in Biota, die unfähig sind die aromatischen Verbindungen effizient zu eliminieren [SGE00] Eine Folge dessen zeigt sich in der Toleranz des untersuchten Bakteriums *P. inhibens* DSM 17395, das in Küstenregionen vorkommt. Die aromatischen Verbindungen die mittels der PM-Technik positiv getestet wurden, können wie folgt beschrieben werden:

1,10-Phenanthrolin ist ein klassischer Ligand, der die Fähigkeit hat eine Vielzahl an Metallionen bindend mit besonderen Variationen von Komplexen zu koordinieren. Beispielsweise können Metallkomplexe mit *1,10-Phenanthrolin* befähigt werden eine intensive Lumineszenz zu bilden oder sie interagieren mit DNA. Sogar eine DNA-Spaltung ist möglich. Deshalb wird der Aromat chemisch synthetisiert und modifiziert, um neue molekulare Chemosensoren für Metallkationen und -anionen, Ionophoren und interkalierende Agentien für Polynukleotide zu entwickeln. [BL10]

3,5-Dinitrobenzoesäure ist eine organisch chemische Verbindung und zählt zu den Aromaten. Die Struktur besteht aus einem Benzolring mit angefügter Carboxygruppe und zwei Nitrogruppen als Substituenten. Sie leitet sich sowohl von der Benzoessäure als auch vom Nitrobenzol bzw. Dinitrobenzol ab und gehört zur Stoffgruppe der Dinitrobenzoesäuren. Die 3,5-Dinitrobenzoesäure findet vor allem Verwendung in der Analyse organischer Substanzen. [LDZ⁺88]

1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen ist eine chemische Verbindung, bestehend aus einem Benzolring mit einem Chlor und zwei Nitrogruppen als Substituenten. Es gehört zur Stoffgruppe der Dinitrochlorbenzole, bei der sich durch unterschiedliche Anordnung der Substituenten sechs Konstitutionsisomere ergeben.

Die Verbindung wird als Reagenz für Alkylierungs-, Arylierungs- und, Substitutionsreaktionen und zur Herstellung von Farbstoffen, Photochemikalien, Explosivstoffen, Fungiziden und Kautschukchemikalien verwendet [GESTIS-Stoffdatenbank].

2,4-Dinitrophenol (DNP) ist ein gelber kristalliner Feststoff mit phenolartigem Geruch. Die Struktur besteht aus einem Benzolring mit einer Hydroxygruppe und zwei Nitrogruppen als Substituenten. Es gehört zur Stoffgruppe der Dinitrophenole, einer Gruppe von sechs Konstitutionsisomeren. Im ersten Weltkrieg wurde DNP von den Franzosen in der Herstellung von Munition genutzt. Folgend wurde DNP als Farbstoff, Holzschutzmittel, Herbizid und Fotochemikalie verwendet. In den 1930er Jahren wurde DNP als Mittel gegen Fettleibigkeit verkauft. DNP ist ein Protonenionophor und wirkt als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien der Zelle. [GDEZW11] Wegen seiner Gefährlichkeit und seiner gleichzeitig geringen therapeutischen Breite entzog 1938 schließlich die amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA) die Zulassung für den Verkauf von DNP-enhaltenen Medikamenten [BBG10].

6.3.6 PM - anorganische Substrate

Die Möglichkeit der Verwertung von *anorganischen Substraten* erweitert die Vielfalt der Stoffwechsellmöglichkeiten und damit den tolerierten Lebensraum. Auch Vertreter der *Roseobacter*-Klade sind in der Lage anorganische Substrate zu verwerten. Unter anaeroben Bedingungen ist z.B. *Dinoroseobacter shibae* DSM 16493 in der Lage via Denitrifikation mit Nitrat, Nitrit, NO und N₂O als terminalen Elektronenakzeptoren zu wachsen [PBD⁺09]. Manche der Gene, die für die Denitrifikation notwendig sind, kodieren auf extrachromosomalen Elementen von *D. shibae* DSM 16493. Obwohl *P. inhibens* DSM 17395 *Nitrat-reduktase* negativ getestet wurde [MHP⁺06], sind notwendige Gene der Denitrifikation extrachromosomal kodiert, siehe Tabelle 5.1. Auch für Zink kodieren sieben Kernenzyme auf dem großen 262 kb-extrachromosomalen Element von *P. inhibens* DSM 17395, siehe Tabelle 5.2. Auf dem großen 262 kb-Chromid konnten des Weiteren Regulatoren zugehörig dem Schwermetallmetabolismus und dem Schwefeloxidasenzym-Systems identifiziert werden, siehe Tabelle 5.1. Zusätzlich befinden sich extrachromosomal kodiert zahlreiche Kernenzyme, die dem Transport von Schwermetallen bzw. anorganischen Substraten

zugeordnet werden können, siehe Tabelle 5.3, Tabelle 5.4, Tabelle 5.5, Tabelle 5.6.

Die Toleranz *P. inhibens* DSM 17395 gegenüber anorganischen Substraten erstreckte sich im PM-Experiment über 23 Substanzen. Dabei war der genetische Code des 262 kb-großen Chromids relevant für die Toleranz gegenüber *Cesiumchlorid*, *Ruthenium Rot*, *Aluminumsulfat*, *Chromiumchlorid* und *Methyltrioctylammoniumchlorid*, siehe Tabelle 5.8. Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *Nickelchlorid*, *Kaliumchromat*, *Natriumcyanat*, *Natriumdichromat*, *Natriumarsenat*, *Borsäure*, *Zinkchlorid*, *Natriummetaborat*, *Natriumwolframat*, *Natriumperiodat*, *Hexaammincobalt(III)-chlorid* und *Kaliumtellurit*, siehe Tabelle 5.17. Der genetische Code des Chromsoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids war maßgeblich für die Toleranz gegenüber *Natriumnitrit*, *Natriumazid* und *Natriumsilicat*, siehe Tabelle 5.27. In einer Sonderreaktion zeigte sich die Toleranz gegenüber *Lithiumchlorid*, *Hydroxylamin* und *Phenylarsinoxide*, siehe Tabelle 5.30.

Schwermetalle wie Kupfer, Zink und Blei sind normale Komponenten mariner Umgebungen und Flussmündungen. Wenn zusätzliche Schwermetallbelastungen von Industrieabfällen oder Abwässern in den biogeochemischen Zyklus eintreten, können auch toxische Reaktionen die Folge für marine Organismen sein. [Bry71] Selvin *et. al* [SSS⁺09] untersuchten in ihrer Studie Schwamm-assoziierte marine Bakterien als Indikatoren für die Verschmutzung durch Schwermetalle. Darunter auch ein Vertreter der *Roseobacter*-Klade, *Roseobacter sp. (MSI09)*, der, wie auch die Ergebnisse dieser Studie für *P. inhibens* DSM 17395 zeigen, eine Resistenz gegenüber den getesteten Schwermetallen aufweist. Die Studie weist auf die auffällig hohe Präsenz der Plasmide hin und auf die Möglichkeit des Plasmid-kodierten Resistenzfaktors. Gene für Schwermetall-Toleranzen sind bei Bakterien häufig Plasmid-kodiert [SM88].

6.3.7 PM - halogenhaltige Substrate

Methylhalogen-abbauende Bakterien spielen potentiell in der Reduktion des Ozonlochs eine wichtige Rolle bezüglich der Methylchlorid- und Methylbromid-Emissionen [MWM⁺02]. Besonders Bakterienspezies der *Roseobacter*-Klade sind bezüglich ihrer Toleranz oder gar Verwertung von halogenhaltigen Substraten identifiziert und beschrieben [SMNM05]. Bei der Spezies *Leisingera*

methylohalidivorans DSM 14336^T kodiert auf dem großen extrachromosomalen Element der Stoffwechselweg für Methylchlorid [BCP⁺13].

In dieser Studie zeigte *P. inhibens* DSM 17395 eine Toleranz gegenüber 20 halogenhaltigen Substraten. Dabei war der genetische Code des 262 kb-großen Chromids relevant für die Toleranz gegenüber *5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-SO₄* (auch *Chloroxylenol*), siehe Tabelle 5.8. Das kleine 65 kb-große Chromid war bedeutsam für die Toleranz gegenüber *5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-b-D-galactopyranosid* und *5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-a-D-mannosid*, siehe Tabelle 5.14. Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *X-b-D-Glucosamin*, *X-b-D-Glucuronid*, *X-PO₄*, *Iodessigsäure*, *5-Chloro-7-iod-8-hydroxychinolin*, *5,7-Dichloro-8-hydroxychinolin*, *5,7-Dichloro-8-hydroxy-Chinaldin*, *Hydrochlorid*, *5-Fluororotsäure* und *Benzethoniumchlorid*, siehe Tabelle 5.18. Das X steht hierbei für X = 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl. Der genetische Code des Chromsoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids war maßgeblich für die Toleranz gegenüber *X-Caprylsäure*, *X-a-D-Galactosid*, *X-a-D-Glucosid*, *X-a-D-Glucuronid*, *X-b-D-Galactosid*, *X-b-D-Glucosid*, siehe Tabelle 5.27. In einer Sonderreaktion zeigte sich die Toleranz gegenüber *5-Fluoro-5'-deoxyuridin*.

Unter den von *P. inhibens* DSM 17395 tolerierten halogenhaltigen Substraten befinden sich auch **Desinfektionsmittel** wie z.B. *Benzethoniumchlorid*. Es handelt sich dabei um eine chemische Verbindung aus der Gruppe der Chloride. Benzethoniumchlorid wird in der Kosmetikindustrie und bei Arzneimitteln als Konservierungsmittel eingesetzt. Für eine Verwendung in der Lebensmittelindustrie ist Benzethoniumchlorid in Deutschland nicht zugelassen. In der klinischen Diagnostik dient es als Reagenz bei der Bestimmung von Protein in Urin und cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF). Als kationisches Detergenz findet Benzethoniumchlorid ferner in der Biochemie als Proteaseinhibitor Anwendung. Benzethoniumchlorid ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Desinfektionsmittel zur lokalen Desinfektion. [Pharma Wiki]

6.3.8 PM - Psychopharmaka

Psychopharmaka sind Substanzen, die bestimmte Stoffwechselvorgänge im Gehirn beeinflussen und so die psychische Verfassung verändern – psychoaktive bzw. -trope Effekte. Die Substanzen, die im Medikament enthalten sind, wirken entweder direkt oder indirekt über ihre Stoffwechselprodukte im Körper.

Bei den Psychopharmaka werden üblicherweise sieben Gruppen unterschieden: **Antidepressiva**, **Stimmungsstabilisierer** (Phasenprophylaktika), **Antipsychotika** (Neuroleptika), **Anxiolytika / Hypnotika**, **Antidementiva**, **Psychostimulanzien** und **Sonstige Psychopharmaka**. [<https://www.neurologen-und-psychiater-im-netz.org/>; Herausgegeben von Berufsverbänden und Fachgesellschaften für Psychiatrie, Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychotherapie, Psychosomatik, Nervenheilkunde und Neurologie aus Deutschland und der Schweiz.]

P. inhibens DSM 17395 zeigte aufgrund der genetischen Information des 262 kb-großen Chromids eine Toleranz gegenüber *Amitriptylin*; ein trizyklisches **Antidepressivum** (Dibenzozykloheptadien-Derivat), eine chemisch heterogene, antriebssteigernd und stimmungsaufhellend bzw. anxiolytisch und antriebsdämpfend wirkende Untergruppe der Psychopharmaka, mit breitem Wirkungsspektrum [Psc02].

Auf Grund der genetischen Information des kleinen 65 kb-Chromids in Kombination mit dem großen 262 kb-Chromid war *P. inhibens* DSM 17395 tolerant gegenüber dem Psychopharmakon *Promethazin*, siehe Tabelle 5.19.

Promethazin internationaler Freiname für das Antihistaminikum und Sedativum (Tranquilizer). Verwendet wird das Monohydrochlorid. Promethazin-Hydrochlorid, ein Vertreter aus der Gruppe der Phenothiazine, wurde in den späten 1930er Jahren erstmals arzneilich angewendet. In erster Linie handelt es sich um ein Antihistaminikum, das folglich antagonistisch an H1-Rezeptoren anknüpft, sodass Histamin hier nicht binden kann. Aufgrund der Tatsache, dass auch im ZNS Histaminrezeptoren vorliegen, wirkt es schlaffördernd und sedierend und wird daher vor allem zur Therapie von Erregungszuständen als **Stimmungsstabilisierer** herangezogen. [Pharma Wiki]

Bei dem Psychopharmakon *Chlorpromazin* zeigte sich die Toleranz dagegen in einer Sonderreaktion, siehe Tabelle 5.31.

Chlorpromazin ist ein Psychopharmakon aus der Klasse der Phenothiazine, ein **Antipsychotikum** (Neuroleptikum). Es hat wie alle Neuroleptika generell eine symptomatische Wirkung. Das bedeutet, dass es als Medikament die Symptome einer Erkrankung bekämpft und lindert, nicht jedoch die Ursache beseitigt. Es entfaltet seine pharmakologische Wirkung direkt im Gehirn, wo es den Stoffwechsel der Neurotransmitter beeinflusst. Die Substanz wirkt dabei vor allem hemmend auf verschiedene Rezeptoren für den Neurotransmitter Dopamin. Durch die Einwirkung auf diese unterschiedlichen Rezeptoren des

Dopaminsystem in den Nervenzellen des Gehirns hat es im Vergleich zu anderen Neuroleptika eine relativ breite Wirksamkeit. So sind sowohl sedierende, antipsychotische, antihistaminische (antiallergische), antiemetische (Erbrechen und Übelkeit beeinflussende), sowie anticholinerge (muskel- und Drüsen beeinflussende) und antiadrenerge (die Adrenalinwirkung beeinflussende) Auswirkungen auf den Körper bei Einnahme von Chlorpromazin bekannt. [Pharma Wiki]

In einer Studie von Bossus *et. al* [BGS⁺14] wurden die Auswirkung von Psychopharmaka auf *Crustaceen* mit umweltbedingt relevanten Konzentrationen von 0,001 to 1 Mikrogramm pro Liter untersucht. Eine Toleranzbildung gegen Psychopharmaka von Bakterien, wie in dieser Studie am Meeresbakterium *P. inhibens* DSM 17395 detektiert, ist nicht auszuschließen.

6.3.9 PM - Antiseptika

Antiseptika sind mikrobiozide oder viruzide Wirkstoffe zur prophylaktischen Antisepsis auf Haut- und Schleimhäuten, sowie zur Therapie lokaler Infektionen. Antiseptika wirken durch Denaturierung, Herabsetzung von Oberflächenspannungen und Wechselwirkungen mit dem Erregerstoffwechsel. [Psc02].

Die Toleranz *P. inhibens* DSM 17395 gegenüber Antiseptika erstreckte sich im PM-Experiment über zwei Substanzen.

Dabei war der genetische Code des 262 kb großen-Chromids relevant für die Toleranz gegenüber *Dequalinium*, siehe Tabelle 5.12. *Dequalinium* ist ein antimikrobieller Wirkstoff, der in Form von Vaginaltabletten zur Behandlung einer bakteriellen Vaginose oder eines Scheidenpilzes eingesetzt wird. Im Unterschied zu anderen Arzneimittel hat Dequaliniumchlorid ein breites Wirkungsspektrum gegen Bakterien, Pilze und Einzeller. [DNG⁺02]

Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber dem *Biguanid Alexidin* [CG89], siehe Tabelle 5.19.

6.3.10 PM - Zytostatika

Zytostatika sind eine chemisch heterogene Gruppe zytotoxischer Substanzen, die das Zellwachstum, insbesondere die Zellteilung, verhindern oder verzögern. Zytostatika wirken nur auf proliferierende Zellen, das heißt in den Phasen des Zellzyklus und nicht in der Ruhephase (G0). Sie werden in der Tumorthherapie

eingesetzt, da Tumorzellen nicht der physiologischen Wachstumsregulation unterliegen und eine höhere Zellteilungsrate aufweisen als normale Körperzellen. Die unspezifisch wirkenden Zytostatika sollen in kombinierter bzw. sequenzieller Anwendung (Polychemotherapie) den Zellzyklus in verschiedenen Phasen stoppen und dabei bessere Ergebnisse erzielen und weniger unerwünschte Arzneimittelwirkung haben als bei Monotherapien. Eine Einteilung der Zytostatika nach dem Wirkungsmechanismus ergibt acht Klassen. **Alkylanzien**, **Antimetabolite**, **Mitosehemmstoffe**, **Antibiotika** mit hemmender Wirkung auf die DNA-abhängige RNA-Polymerase, **Enzyme**, **Topoisomerase-I-Hemmer**, **Aromatasehemmer**, andere Zytostatika, wie Hydroxycarbamid oder Hormone zur Tumorthherapie. [Psc02]

Mittels der PM-Technologie konnten in dieser Studie Zytostatika der Klasse der **Alkylanzien**, der **Antimetabolite** und der **Antibiotika** untersucht werden.

Auf den Chromiden von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 befinden sich zahlreiche Multidrogentransporter und Multipheromontransporter, siehe Tabelle 5.3 und Tabelle 5.4, sowie multiple Antibiotikaresistenz-Regulatoren, siehe Tabelle 5.5 und Tabelle 5.6. Diese genetischen Informationen könnten die Toleranz gegenüber der zahlreichen Zytostatika begründen.

In der Literatur lassen sich zahlreiche Beispiele über die Detektion von pharmazeutischen Erzeugnissen, wie z.B. auch Zytostatika, in den Weltmeeren finden [GTH14]. So wurden in der Studie von Klosterhaus *et. al* 60 Pharmazeutika in marinen Biota detektiert, wobei die am häufigsten auftretende Klasse dabei die *Antibiotika* waren [KGYH13]. Pickney *et. al* berichteten in ihrer Studie über die Reduktion der Biomasse von Mikroalgen und der primären Produktivität, sowie des retardierten *Diatomeen* Wachstums durch antimikrobielles *Tylosin* (Wirkstoffklasse der *Makrolide*) im Sediment des North Inlet Estuary (USA) [PHLL13].

6.3.11 PM - Zytostatika - Alkylanzien

Alkylanzien sind eine Gruppe zytotoxisch wirkender Stoffe durch Alkylierung (Einbau von Alkylgruppen) von Phosphat-, Amino-, Sulfhydryl-, Carboxyl-, und Hydroxylgruppen der Nukleinsäuren sowie Proteine mit Hemmung der Zellteilung; wirken selbst kanzerogen. [Psc02]

Chlorambucil ergab als Sonderreaktion ein positives Ergebnis, wird also von

P. inhibens DSM 17395 toleriert, Tabelle 5.30. *Chlorambucil* wirkt zytostatisch und immunsuppressiv. Es hemmt die Bildung von *Lymphozyten*. [Psc02]

6.3.12 PM - Zytostatika - Antimetabolite

Antimetabolite sind Substanzen, die aufgrund struktureller Ähnlichkeit oder Fähigkeit zur Bindung einen Stoffwechselprozess blockieren. Sie werden in drei Gruppen unterteilt. **1.** Strukturähnliche Antimetabolite: konkurrieren aufgrund chemischer Ähnlichkeit mit dem Metaboliten ohne Übernahme der Funktion. **2.** Strukturverändernde Antimetaboliten: binden den Metaboliten, was dessen Funktion oder Resorption verhindert oder den Metaboliten chemisch modifiziert. **3.** Indirekt wirkende Antimetaboliten: beeinträchtigen die Funktion des Metaboliten, z.B. über Bindung von Ionen. [Psc02]

P. inhibens DSM 17395 zeigte im phänotypischen MicroArray eine Toleranz gegenüber elf Antimetaboliten. Sechs davon lassen sich auf den genetischen Code des 262 kb-großen Chromids zurück führen: *5-Fluoruracil*, *Mercaptopurin*, *Cytarabin*, *4-Aminopyridin*, *Benserazid* und *Cetylpyridiniumchlorid*, siehe Tabelle 5.9. Ein Antimetabolit auf den genetischen Code des kleinen 65 kb-großen Chromids (*Hydroxyurea*), siehe Tabelle 5.15, und einer auf den genetischen Code des kleinen 65 kb-Chromids in Kombination mit dem großen 262 kb-Chromid: *5-Azacytidin*, siehe Tabelle 5.19. Zwei Antimetabolite lassen sich auf den genetischen Code des Chromosoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids zurück führen; *Guanazol* und *Azathioprin*, siehe Tabelle 5.28. Bei dem Antimetabolit *Trifluorthymidin* zeigte sich die Toleranz dagegen in einer Sonderreaktion, siehe Tabelle 5.30.

Strukturähnlichen Antimetaboliten

Die positiv getesteten *strukturähnlichen Antimetaboliten* (**1.**) können in die Untergruppen der *Pyrimidinanaloga* oder *Purinanaloga* zugeordnet werden:

Pyrimidinanaloga

5-Fluoruracil

Cytarabin

Cetylpyridiniumchlorid

5-Azacytidin

Trifluorthymidin

Purinanaloga

Mercaptopurin

Guanazol

Azathioprin

Strukturverändernde Antimetaboliten

Zwei der positiv getesteten Antimetaboliten lassen sich den *strukturverändernde Antimetaboliten 2.* zuordnen:

Benserazid ist ein *L-DOPA-Decarboxylasehemmer*. *Benserazid* inhibiert die Metabolisierung von *L-DOPA* (*Levodopa*) und wird ausschließlich in Kombinationspräparaten zusammen mit *Levodopa* zur Therapie der nicht durch Medikamente ausgelösten Parkinson-Krankheit eingesetzt. Heute wird das Restless-Legs-Syndrom (RLS) häufig mit der Kombination *L-DOPA* und *Benserazid* behandelt. *Dopamin* selbst ist zur Behandlung von Parkinson-Kranken ungeeignet, vor allem weil es die Blut-Hirn-Schranke kaum passiert. Seine Vorstufe (Prodrug) *Levodopa* wird dagegen als Aminosäure durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert und ist heute das wirksamste und wichtigste Parkinsonmittel. Man verabreicht es fast nur noch in peroraler Darreichungsform und praktisch immer zusammen mit *Benserazid* oder *Carbidopa*. Diese Substanzen sind Inhibitoren des Enzyms *Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase* (*Dopadecarboxylase*), das die Umwandlung von *Levodopa* in *Dopamin* katalysiert. *Benserazid* passiert die Blut-Hirn-Schranke nicht, blockiert das Enzym also nur peripher (außerhalb des Zentralnervensystems). Dort würde *Levodopa* ohne *Dopadecarboxylase*-Hemmstoff zu 95% zu *Dopamin* decarboxyliert. [Pharma Wiki]

Hydroxyurea; Die Wirkung von *Hydroxyurea* beruht auf der Hemmung des Enzyms *Ribonukleotidreduktase*, wodurch die DNA-Synthesekapazität der jeweiligen Zelle deutlich eingeschränkt wird [Psc02].

Indirekt wirkende Antimetaboliten

Zwei der positiv getesteten Antimetaboliten lassen sich den *indirekt wirkende Antimetaboliten 3.* zuordnen:

4-Aminopyridin (*Fampridin*), ein *Aminopyridin*. *Fampridin* ist ein Kaliumkanalblocker. Er wirkt auf geschädigte Nerven, wo er verhindert, dass geladene Kaliumteilchen aus den Nervenzellen entweichen. Es wird angenommen, dass dadurch die elektrischen Impulse weiter an den Nerven entlang wandern

können, um die Muskeln zu stimulieren. Dadurch wird das Gehen erleichtert. Antimetabolit zur Behandlung von *Multiple Sklerose*. [Pharma Wiki] [Psc02]

6.3.13 PM - Zytostatika - Antibiotika

Antibiotika sind im engeren Sinne eine Bezeichnung für bestimmte Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, Streptomyzeten oder Bakterien. Im weiteren Sinne auch für deren (semi-)synthetische Derivate mit bakteriostatischer (z.B. Tetrazykline, Chloramphenicol, Makrolid-Antibiotika) oder bakterizider (z.B. Penicilline, Cephalosporine, Aminoglykosid-Antibiotika, Polymyxine) Wirkung.

Die Wirkungsmechanismen können in vier Kategorien eingeteilt werden: **1.** Hemmung der Zellwandsynthese (Mureinsynthese), z.B. durch Penicilline, Cephalosporine. **2.** Hemmung der DNA- und RNA-Synthese, z.B. durch Chinolone und Rifampicin. **3.** Hemmung der Proteinsynthese, z.B. durch Aminoglykosid-Antibiotika, Tetrazykline, Makrolid-Antibiotika. **4.** Beeinflussung der Zellmembran (Permeabilität), z.B. durch Polymyxine. [Psc02]

Antibiotika können auch ein größeres Spektrum abdecken und neben der antibiotischen Wirkung eine antiparasitäre Wirkung aufweisen. Als *Antiparasitika* bezeichnet man Arzneistoffe, die gegen Endo- oder Ektoparasiten eingesetzt werden [KSB11].

Wirkstoffe gegen **Ektoparasiten** sind: *Akarizide* gegen Milben, *Insektizide* gegen Insekten oder *Repellentien* (Insektenabwehrmittel). Wirkstoffe gegen **Endoparasiten** sind: *Anthelminthika* gegen Würmer und *Antiprotozoika* gegen Einzeller.

Der Kontakt von Mikroorganismen zu subletalen Konzentrationen von antimikrobiellen Substanzen, Antibiotika inbegriffen, kann eine Antibiotikaresistenz induzieren. Die übertriebene Verabreichung von prophylaktischen Antibiotikagaben, in der Humanmedizin und in der Aquakultur, ist ein wachsendes Problem für die humane und animalische Gesundheit, sowie für die Umwelt [Cab06]; zusätzlich die Umweltbelastung durch Abwässer. Diesbezüglich muss die Aufmerksamkeit auf die Mechanismen der Übertragung der Antibiotikaresistenzen zwischen Bakterienspezies gelenkt werden. Dazu wurden von hohen Raten des horizontalen Gentransfers in marinen Bakterien berichtet. Eine Antibiotikaresistenzbildung wurde in Fischen, marinen Säugern und Seevögeln sowie marinen Bakterien detektiert. Die Präsenz von Antibiotikaresistenzgenen in marinen Ökosystemen könnte ein Indikator für die ökologische Veränderung

sein, die durch die Präsenz von Pharmazeutika stattfindet. [GTH14]

Das marine Bakterium *Phaobacter inhibens* DSM 17395 toleriert im phänotypischen MicroArray ein bemerkenswert breites Spektrum von 55 unterschiedlichen Antibiotika.

Das Bakterium selbst ist auf Grund seines großen 262 kb-Chromids in der Lage das Antibiotikum *Tropodithietic Acid* (TDA) zu synthetisieren [BBH⁺04] [GBN⁺08] [BBL⁺12] [DZB10] [PWN⁺11] [BND14]. Dieses Antibiotikum besitzt eine antikanzerogene Wirkung [WWGS16]. Es gibt bereits erste Bemühungen *P. inhibens* DSM 17395 wegen des produzierten Antibiotikums als Biozid bzw. probiotisches Bakterium einzusetzen, um den Resistenzbildungen durch den enormen Einsatz von Antibiotika in der Lebensmittelindustrie entgegen zu wirken [RGD⁺16].

Im Folgenden sind die Antibiotika gelistet, die von *P. inhibens* DSM 17395 im PM Experiment toleriert wurden. Die Einteilung wurde entsprechend des Wirkungsmechanismus gewählt, der die **1.** Hemmung der Zellwandsynthese (Mureinsynthese), die **2.** Hemmung der DNA- und RNA-Synthese oder die **3.** Hemmung der Proteinsynthese betrifft.

Hemmung der Zellwandsynthese (Mureinsynthese)

B-Lactame – Cephalosporine

Cephalosporine der ersten, zweiten, dritten, vierten und fünften Generation verbindet ihr Wirkungsmechanismus. Cephalosporine der Ersten Generation besitzen eine Wirksamkeit gegen *Staphylokokken* und gegen *Beta-Lactamase*-Bildner. Ihre Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien ist eingeschränkt. Die Zweite Generation zeichnet sich durch eine bessere Resistenz gegen *Beta-Lactamase*, ein Enzym, mit dem sich einige Bakterien, insbesondere gramnegative Stäbchenbakterien, gegen *Beta-Lactam*-Antibiotika schützen können, aus [Fry81] Die Dritte Generation hat ein breiteres Wirkungsspektrum [ESSMR07]. Die Vierte [Gia99] und Fünfte Generation [BMK11] erfassen keine bedeutenden neuen Felder, sondern spezifizieren weitere Wirkungsspektren.

Alle derzeit auf dem Markt erhältlichen Cephalosporine sind nicht wirksam gegen *Enterokokken*, da diese eine Primärresistenz aufweisen, die sogenannte *Enterokokkenlücke*.

P. inhibens DSM 17395 tolerierte Cephalosporine aus der Ersten Generation: *Cefazolin* [Fry81], der Zweiten Generation: *Cefuroxime* und *Cefamandole*

Nafate [Fry81] und der Dritten Generation *Cefotaxime*, *Ceftriaxone* und *Cefoperazone* [ESSMR07].

Dabei war der genetische Code des 262 kb-großen Chromids relevant für die Toleranz gegenüber *Cefotaxime*, siehe Tabelle 5.10. Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *Ceftriaxone*, *Cefazolin* und *Cefuroxime* siehe Tabelle 5.20. In einer Sonderreaktion zeigte sich die Toleranz gegenüber *Cefoperazon* und *Cefamandole*, siehe Tabelle 5.31.

B-Lactame – Monobactame

Die von verschiedenen meist Boden-Bakterien produzierten monozyklischen Beta-Lactam-Antibiotika weisen relativ geringe antibiotische Aktivität auf. Das auf der Grundlage natürlicher *Monobactame* synthetisierte *Aztreonam* ist dagegen hochaktiv gegenüber den meisten getesteten gramnegativen Bakterien und ist in seinem Spektrum ähnlich zu dem von *Gentamicin* und *Tobramycin*, beides *Aminoglykoside*. Außerdem ist es resistent gegenüber den meisten *Beta-Lactamasen*. [BH91]

Der genetische Code des Chromsoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids war maßgeblich für die Toleranz gegenüber *Aztreonam*, das in der Behandlung von Infektionen mit gramnegativen, aeroben Bakterien eingesetzt wird. siehe Tabelle 5.28.

B-Lactame – Penicilline

Penicilline hemmen die bakterielle Zellwandsynthese durch Bindung an penicillinbindende Proteine (PBP). Zu den PBP gehören die Transpeptidasen, welche für die Quervernetzung von Peptidoglykanketten während der Zellwandsynthese verantwortlich sind. [Pharma Wiki] Die Entdeckung von Penicillinen, die konsequente Weiterentwicklung, die großen Produktionsmethoden der Mikrobiologie und der resultierende globale Impact der klinischen Studien und Praxis geben den Penicillinen eine besondere Bedeutung [KD11].

Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber der Breitbandantibiotika *Piperacillin* und *Ampicillin*, siehe Tabelle 5.21.

Fosfomycin

Fosfomycin, auch *Phosphomycin*, ist ein Breitband-Antibiotikum mit Epoxid-Struktur. Chemisch betrachtet ist es mit keinem anderen Antibiotikum verwandt. Es hat eine bakterizide Wirkung durch die Hemmung der Zellwandbiosynthese auf Grund eines anderen Mechanismus als bei den *Beta-Lactam-*

Antibiotika. Sein Wirkungsspektrum bezieht sich auf *Staphylokokken*, *Gonokokken*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonellen*, *Shigellen*, *E. coli* und *Proteus mirabilis*. [BW98]

Das große 262 kb-Chromid zeigte sich als relevant für die Toleranz gegenüber *Phosphomycin*, siehe Tabelle 5.10.

Glykopeptide

Glykopeptide ist eine Bezeichnung für kleinere *Glykoproteine*, die im Tier- und Pflanzenreich eine weit verbreitete Gruppe sind. Sie sind charakteristisch für die sezernierten, d.h. von Drüsen oder anderen Flüssigkeiten sezernierenden Zellen abgegebenen extrazellulären oder an Oberflächenstrukturen gebundenen Proteine, zu denen zahlreiche Enzyme, die meisten Proteohormone, Plasmaproteine, alle Antikörper, Komplementfaktoren, Blutgruppen- und Schleimsubstanzen, sowie viele Membranproteine und Lektine zählen. Glykoproteine sind kovalente Komplexe aus Polypeptidketten und meist mehreren kurzen Heterosaccharidketten. Auf Grund ihrer hohen Viskosität haben sie eine Schmier- und Schutzfunktion, z.B. gegen proteolytische Enzyme, sowie eine Inhibitorwirkung gegen Bakterien und Viren. Glykoproteine sind mitverantwortlich für zelluläre Erkennung von Fremdgewebe und können an der tumorspezifischen antigenen Aktivität beteiligt sein. Bei allen erwähnten Glykogenproteinfunktionen soll der Kohlenhydratanteil die Rolle eines Erkennungssignals für einen Rezeptor spielen. Bei der Glykoproteinsynthese fungiert der Kohlenhydratanteil als Erkennungssignal zur Sekretion der Glykoproteine. [BW98]

Im Ergebnis des phänotypischen MicroArrays war der genetische Code des 262 kb-großen Chromids relevant für die Toleranz gegenüber *Bleomycin*, siehe Tabelle 5.10. Das kleine 65 kb-große Chromid zeigte eine Relevanz für die Toleranz gegenüber *Phleomycin*, siehe Tabelle 5.15.

Polypeptide

Polypeptide oder *antimikrobielle Peptide* (AP) werden von einer Vielzahl von Organismen als ein Teil einer nicht-spezifischen Immunabwehr produziert. Viele AP haben ein großes Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. [BB11]

Das PM ergab eine Toleranz gegenüber *Capreomycin* und *Colistin*, die sich auf die genetische Information des großen 262-kb Chromids bezieht, siehe Tabelle 5.11. Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber der Polypeptide *8-Hydroxychinolin* und *Polymyxin B*, siehe Tabelle 5.21.

Sulfonamide

Sulfonamide sind Zellinhibitoren, die nicht nur Bakterien sondern Zellen aller Art inhibieren [Hen43]. Es handelt sich um eine Sammelbezeichnung für Amide aromatischer Sulfonsäuren, die vor allem als antibakterielle Chemotherapeutika, orale Antidiabetika, Diuretika und Carbonanhydrasehemmer therapeutische eingesetzt werden. Sie besitzen eine Wirkung auf proliferative Bakterien durch Hemmung der *Folsäuresynthetase*, z.T. auch durch Inaktivierung anderer Enzyme mit nachfolgender Hemmung des Bakterienstoffwechsels. Sie haben ein relativ breites Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien bei zunehmender Resistenzentwicklung, ferner gegen bestimmte Protozoen. [Psc02]

Im PM-Ergebnis war der genetische Code des 262 kb-großen Chromids relevant für die Toleranz gegenüber *Sulfanilamide*, siehe Tabelle 5.11. Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *Sulfisoxazol*, *Trimethoprim*, *Sulfadiazin*, *Sulfamethazin*, *Sulfamethoxazol* und *Sulfathiazol*, siehe Tabelle 5.23. In einer Sonderreaktion zeigte sich die Toleranz gegenüber *Sulfamonomethoxin* und *Sulfachloropyridazin*, siehe Tabelle 5.31.

Thionamide

Thioamide, *Ethionamid* und *Prothionamid*, sind klinisch effektiv in der Behandlung von komplexen Infektionen durch *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* und *M. avium*. Obwohl Thioamide eher sekundär bei Tuberkulose genutzt werden, steigt ihr Gebrauch durch die Entwicklung von Multiresistenzen in der Therapie von Tuberkulose. Trotz der weit verbreiteten Nutzung in der Behandlung von Lepra und Tuberkulose, ist der präzise Wirkungsmechanismus noch nicht aufgeklärt. [WLG⁺07]

Der genetische Code des Chromsoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids war maßgeblich für die Toleranz gegenüber *Ethionamid*, siehe Tabelle 5.29.

Hemmung der DNA- und RNA-Synthese

Chinolone

Chinolone wurden vor mehr als 50 Jahren entdeckt. Seitdem gab es beträchtliche Fortschritte im Verständnis der molekularen Mechanismen gegenüber pathogenen Bakterien mit dem Wirkprinzip der Gyrasehemmung. Chinolone binden in der Bakterienzelle an den Komplex des Enzyms Gyrase und

DNA. Sie verhindern dadurch das Wieder-Zusammenfügen eines geschnittenen DNA-Strangs durch das Enzym, welches für das Supercoiling der DNA verantwortlich ist. Die Bakterien sind deshalb nicht mehr in der Lage sich zu vermehren, die bewirkten DNA-Strangbrüche haben wahrscheinlich direkt tödliche Wirkung. [And05] Des Weiteren werden Chinolone besonders gegen Organismen eingesetzt, die gegenüber anderen Antibiotika resistent geworden sind (Antibiotika-Resistenz) [Fre99].

Dabei war der genetische Code des 262 kb-großen Chromids relevant für die Toleranz gegenüber *Norfloxacine*, *Nalidixinsäure* und *Cinoxacin*, siehe Tabelle 5.11. Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *Ciprofloxacine*, *Oxolinsäure*, *Enoxacin*, *Lomefloxacine*, *Ofloxacine* und *Pipemidsäure*, siehe Tabelle 5.22.

Nitrofurane

Nitrofurane, einst für die Behandlung von bakteriellen Infektionen in der Viehhaltung verwendet, wurden 1995 wegen ihrer Karzinogenizität in den Residuen des essbaren Gewebes in der Europäischen Union verboten. Der Metabolismus von Nitrofuranen ist wenig dokumentiert. Der vermutete Mechanismus verläuft über die Spaltung des Nitrofuranrings, die eine kovalente Bindung zum Gewebe ermöglicht. [VHF08]

Das kleine 65 kb-große Chromid war bedeutsam für die Toleranz gegenüber *Nitrofurazone*, siehe Tabelle 5.15. Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *Furaltadon* und *Nitrofurantoin*, siehe Tabelle 5.21.

Nitroimidazole

Nitroimidazole sind in zweierlei Hinsicht von Bedeutung: Durch ihr Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Protozoen, Enhelminthen und hypoxische Tumore; Und des Weiteren durch die geringe Resistenzbildung gegen Anaerobia [Edw93].

P. inhibens DSM 17395 zeigte gegenüber dem Antiprotozoikum *Ornidazole* eine Toleranz. Dabei war der genetische Code des 262 kb-großen Chromids relevant, siehe Tabelle 5.11. Dieses Antiprotozoikum kann nach einer Darmresektion bei *Morbus Crohn* angewendet werden [RVV⁺05]. Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *2-Nitroimidazol*, siehe Tabelle 5.21. Der genetische Code des Chromsoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids war

maßgeblich für die Toleranz gegenüber *Tinidazol*, siehe Tabelle 5.28.

Hemmung der Proteinsynthese

Aminoglykoside

Aminoglykoside werden von *Streptomyces*-Arten (*Streptomycetaceae*) oder *Micromonospora*-Arten (*Micromonosporaceae*) gebildet und sind bakterizide Breitspektrum-Antibiotika mit breitem Wirkspektrum im gramnegativen Bereich [Fre99].

Aminoglykoside binden an die bakterielle 30S-ribosomale Untereinheit, selten auch an die 50S-Untereinheit, und inhibieren die Translokalisierung der peptidyl-tRNA von der A-Seite zur P-Seite, was eine fehlerhafte Ablesung der mRNA zur Folge hat [Whe84], die z.B. dazu führen kann, dass defekte Proteine in die Zellmembran des Bakteriums eingebaut werden, was zur Lyse des Erregers führen kann.

Der genetische Code des 262 kb-großen Chromids zeigte sich als relevant für die Toleranz gegenüber *Hygromycin B*, *Streptomycin* als 1944 erstes Aminoglykosid-Antibiotikum, *Amikacin*, *Geneticin* und *Apramycin*, siehe Tabelle 5.10. Das kleine 65 kb-große Chromid war bedeutsam für die Toleranz gegenüber *Dihydrostreptomycin*, siehe Tabelle 5.15. Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *Tobramycin*, *Paromomycin*, *Sisomicin*, *Gentamicin*, *Kanamycin* und *Neomycin*, siehe Tabelle 5.19 und Tabelle 5.20.

Tetrazykline

Tetrazykline werden von Bakterien der Gattung *Streptomyces* produziert. Als erster Vertreter der Tetrazykline wurde 1948 *Chlortetrazyklin* isoliert.

Tetrazykline binden an die bakterielle 30S ribosomale Untereinheit und inhibieren die Translokalisierung der aminoacyl-tRNA zum mRNA-Ribosomen Komplex. So kommt es zur fehlerhaften Ablesung und in der Folge zu fehlerhaften Zellwänden. [NL11]

Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *Tetrazyklin*, siehe Tabelle 5.22.

Lincosamide

Lincosamide wirken gegen grampositive Bakterien und gegen Protozoen. Sie werden beispielsweise bei Malaria therapeutische genutzt.

Licosamide binden an die bakterielle 50S-ribosomale Untereinheit der rRNA und inhibieren somit die Proteinsynthese. [RSS07]

Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *Lincomycin*, siehe Tabelle 5.20.

6.3.14 PM - unklassifizierte Chemikalien

Die Toleranz *P. inhibens* DSM 17395 gegenüber Substraten, die nicht in übergeordnete Klassen einzuordnen waren, erstreckte sich im PM-Experiment über zehn Substanzen.

Dabei war der genetische Code des 262 kb-großen Chromids relevant für die Toleranz gegenüber *Diamide*, *Thiosalicylate* und *Disulphiram*, siehe Tabelle 5.13. Die Kernenzyme für die Toleranzen sind weiterhin in Tabelle 5.1 gelistet. Bei allen drei Substraten handelt es sich um **schwefelhaltigen Substanzen**.

Diamide ist ein Sulfhydryl-Reagenz das Sulfhydrylgruppen zu ihrer Disulfidform oxidiert. Es ist ein Radiosensitizer, ein Pharmakon, das nach seiner Verabreichung selektiv die Empfindlichkeit von bösartigen Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung erhöht. [War07]

Thiosalicylate ist ein Schwefelanalogen der Salicylsäure, wobei die phenolische Hydroxygruppe durch eine Thiolgruppe (Mercaptogruppe) ersetzt ist [Psc02].

Disulphiram, auch Tetraethylthiuramdisulfid (TETD), (Handelsname Antabus®) ist ein Arzneistoff, der als Entwöhnungsmittel bei Alkoholabhängigkeit angewendet werden kann [Psc02].

Der genetische Code des kleinen 65 kb-Chromids war relevant für die Toleranz gegenüber *Procain*, einem **Lokalanästhetikum** vom Ester-Typ [PubChem], siehe Tabelle 5.15.

Das große 262 kb-Chromid in Kombination mit dem kleinen 65 kb-großen Chromid waren relevant für die Toleranz gegenüber *Lidocain*, *2,4-Diamino-6,7-diisopropylpteridin*, *18-Crown-6-Ether* und *Semicarbazid*, siehe Tabelle 5.24 und Tabelle 5.25.

Lidocain ist ein örtlich wirksames Betäubungsmittel (**Lokalanästhetikum**) vom Typ der Amide. Es wirkt ferner als Klasse Ib-Antiarrhythmikum bei tachykarden Herzrhythmusstörungen. [PubChem]

Bei *2,4-Diamino-6,7-diisopropylpteridin* handelt es sich um ein **Antibiotikum** [SM84].

18-Krone-6-ether ist ein makrozyklischer Polyether. Diese vermögen aufgrund ihrer Konstitution im Zentrum des Ringes Metall-Ionen zu binden. Die Bezeichnung Kronether wurde gewählt, weil alle Sauerstoffatome das Metall-Ion kranz- oder kronenartig umgeben und an der koordinativen Bindung des Metall-Ions beteiligt sind. Kronether werden als Modellsysteme für Alkalicarrier in der Membranchemie und aufgrund ihrer Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln für milde Oxidationen von Alkenen, Alkylbenzolen und Aldehyden mit Kaliumpermanganat in Benzol sowie für die Phasentransferkatalyse verwendet. [Fre99]

Semicarbazide auch N-Aminoharnstoff, ist eine chemische Verbindung und ein Derivat des Harnstoffs. **Nachweisreagens** für Ketone und Aldehyde. Mit diesen Verbindungsklassen bildet Semicarbazid schwerlösliche Semicarbazone. [Fre99]

Der genetische Code des Chromsoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids war maßgeblich für die Toleranz gegenüber *Kristallviolett*, einem Farbstoff, der z.B. als **Nachweisreagens** zur Gramfärbung von grampositiven Bakterien verwendet wird, siehe Tabelle 5.29.

In einer Sonderreaktion zeigte *P. inhibens* DSM 17395 ohne das kleine 65 kb-Chromid eine Toleranz gegenüber *Compound 48/80*, die weder beim Wildtyp noch bei anderen Mutanten auftrat, siehe Tabelle 5.32. Ungewöhnlicherweise kann das Meeresbakterium ohne die genetische Information des kleinen Chromids die Chemikalie tolerieren.

Bei dem Substrat *Compound 48/80* handelt es sich um ein Polymer, das durch die Kondensation von *N-Methyl-p-Methoxyphenethylamin* mit *Formaldehyd* entsteht. *Compound 48/80* setzt *Histamin* frei (**Histaminliberator**) und wird in dieser Eigenschaft zur Entleerung der cytoplasmatischen Granula von Mastzellen in den extrazellulären Raum genutzt. [RAU71]

Möglicherweise werden durch die Exkretion des kleinen Chromids Schutzmechanismen in Bezug auf das biogene Amin *Histamin* aktiviert, die im Phänotyp der anderen Mutanten oder des Wildtyps nicht verwendet werden.

Kapitel 7

Fazit

Das Meeresbakterium *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, ehemals *Phaeobacter gallaeciensis*, gehört der *Roseobacter*-Klade an und wurde ausgehend vom Genotyp, einem Chromosom und drei extrachromosomale Elementen – klassifiziert als Chromide, ehemals Plasmide –, auf seinen Phänotyp hin untersucht.

Neben der Erkenntnis über die unabdingbare geno- und phänotypische Relevanz des großen 262 kb-Chromids und besonders des kleinen 65 kb-Chromids zur Fähigkeit für die Biofilmbildung, die im Vergleich zu anderen Vertretern der *Roseobacter*-Klade herausragend ist, kamen positive Ergebnisse des primären und sekundären Stoffwechsels von *P. inhibens* DSM 17395 zu bereits erforschten Substraten, wie im Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg oder dem Citrat-Zyklus, sowie neuen Substraten, im Rahmen von Gärungs- und Verwesungsprozessen, hinzu.

Die Untersuchung der Chemikalien, die durch die genetische Information des Bakteriums *P. inhibens* DSM 17395 toleriert wurden, ergab ein breites Spektrum von 164 unterschiedlichen Substanzen. Des Weiteren konnte durch die Diskriminanzanalyse die Bedeutung der Chromide des Bakteriums für die Chemikaliertoleranzen detektiert werden. Die größte Bedeutung war bei der Kombination der genetischen Information des 262 kb-Chromids und des 65 kb-Chromids zu verzeichnen: 69 positive Reaktionen. 40 positiven Reaktionen resultierten aus der genetischen Information des großen 262 kb-Chromids. Die genetische Information des kleinen Chromids ergab 8 positive Ergebnisse und der genetische Code des Chromosoms und/ oder des 78 kb-großen Chromids folgte 26 positive Reaktionen. Ferner gab es 21 Sonderreaktionen. Folglich konnten insgesamt 117 positive PM-Ergebnisse auf die gene-

tische Information des großen und/ oder des kleinen Chromids zurück geführt werden, was die Bedeutsamkeit der Chromide von *P. inhibens* DSM 17395 in Bezug auf die Toleranz gegenüber Chemikalien deutlich macht. Zu den tolerierten Chemikalien gehören Substanzen der Klassen der **Biozide**, **Metabolite**, **Sekundärmetabolite**, **Aminosäuren** in Verbindung mit dem **pH-Wert Bereich**, **Aromaten**, **anorganische Substrate**, **halogenhaltige Substrate**, **Psychopharmaka**, **Antiseptika** und **Zytostatika** der Unterklassen **Alkylazien**, **Antimetabolite** und **Antibiotika**. Unter den Chemikalien finden sich auch hoch toxische Substanzen wie *Hexachlorophen* wider, dessen Abbauprodukt (2,3,7,8-substituiert *tetrachloriertes Dibenzo-p-dioxin*) als giftigste bisher synthetisierte Substanz klassifiziert ist. Neben zahlreichen Chromid-kodierten **Multidrogen- und Pheromontransportern**, kodieren auch Chromid-lokalisierte **Regulatoren** sowie **multiple Antibiotikaresistenz-Regulatoren** im Genom von *P. inhibens* DSM 17395. Diese Genomsequenzen könnten maßgeblich für das Toleranzverhalten des Meeresbakteriums gegenüber den zahlreichen Chemikalien verantwortlich sein. Zusätzlich scheint die Präsenz des großen 262 kb-Chromids in Kombination mit dem kleinen 65 kb-Chromid eine wichtige Bedeutung zu haben. Bei einigen Substraten, wie z.B. bei der *Buttersäure*, kam es zu Sonderreaktionen, bei denen das Bakterium ohne das jeweilige Chromid stärker reagierte bzw. resistenter war. Bei diesem Substrat ergab das phänotypische MicroArray für die Mutante ohne das große 262 kb-Chromid eine positive Respirationskurve. Der Wildtyp und die anderen Mutanten hingegen zeigten negative Ergebnisse. Dies könnte durch die jeweilige Substanz, also Lebensbedingung, getriggert worden sein, die das Bakterium zu Stoffwechselvorgängen anregt, die unter normalen Umständen keine Bedeutung haben.

Die Chromid-kodierte Vielfalt der tolerierten Substanzen und die ebenfalls Chromid-kodierte Fähigkeit zur Biofilmbildung könnten im Zusammenhang stehen, da eine Biofilm-Matrix von Bakterien nicht nur als Verdauungs- und Recyclingmöglichkeit, sondern auch als Schutzwall gegen Austrocknung, angereicherte Biozide, einige Antibiotika, metallische Kationen, Ultraviolette Strahlung, viele Protozoen und als eine Immunabwehr genutzt wird.

Zu fast allen Chemikalien gibt es bereits Studien, die eine Präsenz der häufig toxischen Substrate in unterschiedlichen Teilen der Weltmeere nachweisen, so dass eine Toleranzbildung gegenüber der Vielfalt an Chemikalien relevant für das Überleben des Meeresbakteriums erscheint. Die Ausbildung von To-

leranzen diesen Ausmaßes scheint zunächst erschreckend und im Hinblick auf die Unwirksamkeit von unterschiedlichen Antibiotika durch eine Resistenzbildung auch bedrohlich für Mensch und Tier, jedoch kann das Meeresbakterium *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 durch seine genetische Ausstattung, insbesondere der Chromide als adaptive genomische Strukturen, auch in verschmutzten Teilen unserer Weltmeere sein Wirkungsspektrum zur Regeneration und dem Fortbestehen des Ökosystems nutzen.

Literaturverzeichnis

- [ABB⁺08] AZIZ, Ramy K. ; BARTELS, Daniela ; BEST, Aaron a. ; DE-JONGH, Matthew ; DISZ, Terrence ; EDWARDS, Robert a. ; FORMSMA, Kevin ; GERDES, Svetlana ; GLASS, Elizabeth M. ; KUBAL, Michael ; MEYER, Folker ; OLSEN, Gary J. ; OLSON, Robert ; OSTERMAN, Andrei L. ; OVERBEEK, Ross a. ; MCNEIL, Leslie K. ; PAARMANN, Daniel ; PACZIAN, Tobias ; PARRELLO, Bruce ; PUSCH, Gordon D. ; REICH, Claudia ; STEVENS, Rick ; VASSIEVA, Olga ; VONSTEIN, Veronika ; WILKE, Andreas ; ZAGNITKO, Olga: The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. In: *BMC genomics* 9 (2008), jan, 75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>. – DOI 10.1186/1471-2164-9-75. – ISBN 1471216497
- [AEPPS02] ADOLFSSON-ERICI, Margaretha ; PETTERSSON, Maria ; PARKKONEN, Jari ; STURVE, Joachim: Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. In: *Chemosphere* 46 (2002), Nr. 9-10, S. 1485–1489. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00255-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00255-7). – DOI 10.1016/S0045-6535(01)00255-7. – ISBN 0045-6535
- [Alb07] ALBERTS, Bruce: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2007. – 965–977 S. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E14-10-1437>. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E14-10-1437>. – ISBN 978-0-8153-4105-5
- [And05] ANDRIOLE, Vincent T.: The Quinolones : Past , Present , and Future. 41 (2005), Nr. Suppl 2, S. 113–119
- [BAHK09] BABULA, Petr ; ADAM, Vojtech ; HAVEL, Ladislav ; KIZEK, Rene: Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones

- their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. In: *Current Pharmaceutical Analysis* 5 (2009), feb, Nr. 1, 47–68. <http://dx.doi.org/10.2174/157341209787314936>. – DOI 10.2174/157341209787314936. – ISSN 15734129
- [Bal04] BALBI, Howard J.: Chloramphenicol: a review. In: *Pediatrics in review / American Academy of Pediatrics* 25 (2004), aug, Nr. 8, 284–288. <http://dx.doi.org/10.1542/pir.25-8-284>. – DOI 10.1542/pir.25-8-284. – ISBN 0191-9601
- [BB11] BALTZER, Sylvia a. ; BROWN, Melissa H.: Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. In: *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 20 (2011), jan, Nr. 4, 228–35. <http://dx.doi.org/10.1159/000331009>. – DOI 10.1159/000331009. – ISSN 1660-2412
- [BBG10] BARTLETT, James ; BRUNNER, Michael ; GOUGH, Katie: Deliberate poisoning with dinitrophenol (DNP): an unlicensed weight loss pill. In: *Emergency medicine journal : EMJ* 27 (2010), feb, Nr. 2, 159–160. <http://dx.doi.org/10.1136/emj.2008.069401>. – DOI 10.1136/emj.2008.069401. – ISSN 1472-0205
- [BBH⁺04] BRINKHOFF, Thorsten ; BACH, Gabriela ; HEIDORN, Thorsten ; LIANG, Lanfang ; SCHLINGLOFF, Andrea ; SIMON, Meinhard: Antibiotic Production by a Roseobacter Clade-Affiliated Species from the German Wadden Sea and Its Antagonistic Effects on Indigenous Isolates Antibiotic Production by a Roseobacter Clade-Affiliated Species from the German Wadden Sea and Its Antagonistic. In: *Applied and environmental microbiology* 70 (2004), Nr. 4, S. 2560–2565. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.4.2560>. – DOI 10.1128/AEM.70.4.2560
- [BBL⁺12] BERGER, Martine ; BROCK, N. L. ; LIESEGANG, H. ; DOGS, M. ; PREUTH, I. ; SIMON, M. ; DICKSCHAT, J. S. ; BRINKHOFF, T.: Genetic Analysis of the Upper Phenylacetate Catabolic Pathway in the Production of Tropodithietic Acid by *Phaeobacter gallaeciensis*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 78 (2012), mar, Nr. 10, 3539–3551. <http://dx.doi.org/10.1128/>

AEM.07657-11. – DOI 10.1128/AEM.07657-11. – ISSN 0099-2240

- [BCB98] BONILLA, Sylvia ; CONDE, Daniel ; BLANCK, Hans: The photosynthetic responses of marine phytoplankton, periphyton and epipsammon to the herbicides paraquat and simazine. In: *Ecotoxicology* 7 (1998), Nr. 2, 99–105. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008867920179>. – DOI 10.1023/A:1008867920179. – ISBN 0963-9292
- [BCP⁺13] BUDDRUHS, Nora ; CHERTKOV, Olga ; PETERSEN, Jörn ; FIEBIG, Anne ; CHEN, Amy ; PATI, Amrita ; IVANOVA, Natalia ; LAPIDUS, Alla ; GOODWIN, Lynne A. ; CHAIN, Patrick ; DETTER, John C. ; GRONOW, Sabine ; KYRPIDES, Nikos C. ; WOYKE, Tanja ; GÖKER, Markus ; BRINKHOFF, Thorsten ; KLENK, Hans-Peter: Complete genome sequence of the marine methyl-halide oxidizing *Leisingera methylohalidivorans* type strain (DSM 14336T), a representative of the *Roseobacter* clade. In: *Standards in Genomic Sciences* 9 (2013), oct, Nr. 1, 128–141. <http://dx.doi.org/10.4056/sigs.4297965>. – DOI 10.4056/sigs.4297965. – ISSN 1944-3277
- [BGB07] BRUHN, Jesper B. ; GRAM, Lone ; BELAS, Robert: Production of antibacterial compounds and biofilm formation by *Roseobacter* species are influenced by culture conditions. In: *Applied and environmental microbiology* 73 (2007), jan, Nr. 2, 442–50. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02238-06>. – DOI 10.1128/AEM.02238-06. – ISSN 0099-2240
- [BGM05] BUCHAN, Alison ; GONZÁLEZ, José M. ; MORAN, Mary A.: Overview of the marine *Roseobacter* lineage. In: *Applied and environmental microbiology* 71 (2005), Nr. 10, 5665–5677. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.10.5665>. – DOI 10.1128/AEM.71.10.5665. – ISSN 0099-2240
- [BGS08a] BELITZ, H.-D. ; GROSCH, Werner. ; SCHIEBERLE, Peter.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, 2008. – 35 S. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-73202-0>. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-73202-0>. – ISBN 9783540410966

- [BGS08b] BRINKHOFF, Thorsten ; GIEBEL, Helge-Ansgar ; SIMON, Meinhard: Diversity, ecology, and genomics of the Roseobacter clade: a short overview. In: *Archives of microbiology* 189 (2008), jun, Nr. 6, 531–9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-008-0353-y>. – DOI 10.1007/s00203-008-0353-y. – ISSN 0302-8933
- [BGS⁺14] BOSSUS, Maryline C. ; GULER, Yasmin Z. ; SHORT, Stephen J. ; MORRISON, Edward R. ; FORD, Alex T.: Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. In: *Aquatic Toxicology* 151 (2014), jun, 46–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.025>. – DOI 10.1016/j.aquatox.2013.11.025. – ISBN 1879-1514 (Electronic) 0166-445X (Linking)
- [BH91] BREWER, N S. ; HELLINGER, W C.: The monobactams. In: *Mayo Clinic proceedings* 66 (1991), nov, Nr. 11, 1152–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1943248>. – ISSN 0025-6196
- [BL10] BENCINI, Andrea ; LIPPOLIS, Vito: 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. In: *Coordination Chemistry Reviews* 254 (2010), Nr. 17, 2096–2180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.008>. – DOI 10.1016/j.ccr.2010.04.008. – ISSN 00108545
- [BMK11] BAZAN, Jose A. ; MARTIN, Stanley I. ; KAYE, Kenneth M.: *Newer Beta-lactam Antibiotics: Doripenem, Ceftobiprole, Ceftaroline, and Cefepime*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2011.03.009>. Version:jul 2011
- [BND14] BROCK, Nelson L. ; NIKOLAY, Alexander ; DICKSCHAT, Jeroen S.: Biosynthesis of the antibiotic tropodithietic acid by the marine bacterium *Phaeobacter inhibens*. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* 50 (2014), Nr. 41, 5487–9. <http://dx.doi.org/10.1039/c4cc01924e>. – DOI 10.1039/c4cc01924e. – ISBN 0017350000000
- [BNS⁺11] BERGER, Martine ; NEUMANN, Alexander ; SCHULZ, Stefan ; SIMON, Meinhard ; BRINKHOFF, Thorsten: Tropodithietic acid

- production in *Phaeobacter gallaeciensis* is regulated by N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. In: *Journal of bacteriology* 193 (2011), dec, Nr. 23, 6576–85. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.05818-11>. – DOI 10.1128/JB.05818-11. – ISSN 1098-5530
- [Boc01] BOCHNER, Barry R.: Phenotype MicroArrays for High-Throughput Phenotypic Testing and Assay of Gene Function. In: *Genome Research* 11 (2001), Nr. 7, 1246–1255. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.186501>. – DOI 10.1101/gr.186501. – ISBN 1471210512109
- [Boc09] BOCHNER, Barry R.: Global phenotypic characterization of bacteria. In: *FEMS Microbiology Reviews* 33 (2009), jan, Nr. 1, 191–205. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00149.x>. – DOI 10.1111/j.1574-6976.2008.00149.x. – ISSN 0168-6445
- [BPG⁺13] BUDDRUHS, Nora ; PRADELLA, Silke ; GÖKER, Markus ; PÄUKER, Orsola ; PUKALL, Rüdiger ; SPRÖER, Cathrin ; SCHUMANN, Peter ; PETERSEN, Jörn ; BRINKHOFF, Thorsten: Molecular and phenotypic analyses reveal the non-identity of the *Phaeobacter gallaeciensis* type strain deposits CIP 105210T and DSM 17395. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 63 (2013), nov, Nr. 11, 4340–9. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.053900-0>. – DOI 10.1099/ijs.0.053900-0. – ISSN 1466-5034
- [BPNL96] BACON, C W. ; PORTER, J K. ; NORRED, W P. ; LESLIE, J F.: Production of fusaric acid by *Fusarium* species. In: *Applied and Environmental Microbiology* 62 (1996), nov, Nr. 11, 4039–4043. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8899996><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC168225>. – ISBN 0099-2240 (Print)\r0099-2240 (Linking)
- [BPS82] BEILHARZ, Vyrna C. ; PARBERY, D.G. ; SWART, H.J.: Dodine: A selective agent for certain soil fungi. In: *Transactions of the British Mycological Society* 79 (1982), jan, Nr. 3, 507–511. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(82\)80043-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(82)80043-0). – DOI 10.1016/S0007-1536(82)80043-0. – ISSN 0007-1536

- [Bry71] BRYAN, G. W.: The effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)* 177 (1971), Nr. 48, 389–410. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1971.0037>. – DOI 10.1098/rspb.1971.0037. – ISBN 0962–8452
- [BS77] BOCHNER, B. R. ; SAVAGEAU, M. A.: Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. In: *Applied and Environmental Microbiology* 33 (1977), feb, Nr. 2, 434–444. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/322611><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC170700>. – ISSN 00992240
- [Bun06] BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, BfR: Triclosan nur im ärztlichen Bereich anwenden, um Resistenzbildungen vorzubeugen. In: *Transport* (2006), Nr. 030, 1–6. <http://www.bfr.bund.de>
- [BW98] BURGER, Artur ; WACHTER, Helmut ; BURGER, Artur (Hrsg.) ; WACHTER, Helmut (Hrsg.): *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*. 8. Auflage. Berlin, New York : De Gruyter, 1998. – 1505 S. – ISBN 978–3–11–020632–6
- [Cab06] CABELLO, Felipe C.: *Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment*. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>. Version:jul 2006
- [CAB⁺14] CASPI, Ron ; ALTMAN, Tomer ; BILLINGTON, Richard ; DREHER, Kate ; FOERSTER, Hartmut ; FULCHER, Carol A. ; HOLLAND, Timothy A. ; KESELER, Ingrid M. ; KOTHARI, Anamika ; KUBO, Aya ; KRUMMENACKER, Markus ; LATENDRESSE, Mario ; MUELLER, Lukas A. ; ONG, Quang ; PALEY, Suzanne ; SUBHRAVETI, Pallavi ; WEAVER, Daniel S. ; WEERASINGHE, Deepika ; ZHANG, Peifen ; KARP, Peter D.: 2007. The MetaCyc Database of metabolic pathways. In: *Nucleic Acids Research* 42

- (2014), jan, Nr. D1, 471–480. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1103>. – DOI 10.1093/nar/gkt1103. – ISBN 1362–4962 (Electronic)\r0305–1048 (Linking)
- [CB13] CUDE, W N. ; BUCHAN, Alison: Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing in the *Roseobacter* clade: Complex cell-to-cell communication controls multiple physiologies. In: *Frontiers in Microbiology* 4 (2013), Nr. NOV, 336. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00336>. – DOI 10.3389/fmicb.2013.00336. – ISSN 1664302X
- [CEOO05] CAM, Afr J T. ; ELUJOBA, A A. ; ODELEYE, O M. ; OGUNYEMI, C M.: Review TRADITIONAL MEDICINE DEVELOPMENT FOR MEDICAL AND DENTAL PRIMARY HEALTH CARE DELIVERY SYSTEM IN the orthodox medicine , as currently made available today in Nigeria (as in most African countries), so long as every nook and corner of our rural popu. In: *Afr. J. Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 2 (2005), Nr. 1, S. 46–61
- [CG89] CHAWNER, JUDI A. ; GILBERT, P.: A comparative study of the bactericidal and growth inhibitory activities of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine. In: *Journal of Applied Bacteriology* 66 (1989), mar, Nr. 3, 243–252. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02475.x>. – DOI 10.1111/j.1365–2672.1989.tb02475.x. – ISBN 1365–2672
- [Cib98] CIBA: Toxicological and ecological data/Official registration. In: SPECIALTY, Ciba (Hrsg.) ; INC., Chemical H. (Hrsg.): *IRGASAN DP 300/IRGACARE MP*. Basle, Switzerland : Brochure no. 2521, 1998
- [Cop92] COPPER, R D.: The carbacephems: a new beta-lactam antibiotic class. In: *The American journal of medicine* 92 (1992), jun, Nr. 6A, 2S–6S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1621741>. – ISSN 0002–9343

- [CRM03] CAMPBELL, Neil A. ; REECE, Jane B. ; MARKL, Jürgen ; FISCHER, Gustav (Hrsg.): *Biologie*. 6. Auflage. Heidelberg, Berlin : Spektrum Akademischer Verlag, 2003. – ISBN 9783827413529
- [CUG⁺13] CELIKYURT, Ipek K. ; UTKAN, Tijen ; GOCMEZ, Semil S. ; HUDSON, Alan ; ARICIOGLU, Feyza: Effect of harmaline, an endogenous Beta-carboline, on learning and memory in rats. In: *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 103 (2013), jan, Nr. 3, 666–671. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2012.10.011>. – DOI 10.1016/j.pbb.2012.10.011. – ISSN 00913057
- [Dav11] DAVIS, Sumari: Macrolides and ketolides: More than just antimicrobials. In: *SA Pharmaceutical Journal* 78 (2011), Nr. 6, 24–27. <http://www.sapj.co.za/index.php/SAPJ/article/viewFile/1041/1306{%}%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS{%}%PAGE=reference{%}%D=emed10{%}%NEWS=N{%}%AN=2011439038>. – ISBN 1015–1362
- [DHT⁺14] DRÜPPEL, Katharina ; HENSLER, Michael ; TRAUTWEIN, Kathleen ; KOSSMEHL, Sebastian ; WÖHLBRAND, Lars ; SCHMIDT-HOHAGEN, Kerstin ; ULBRICH, Marcus ; BERGEN, Nils ; MEIER-KOLTHOFF, Jan P. ; GÖKER, Markus ; KLENK, Hans P. ; SCHOMBURG, Dietmar ; RABUS, Ralf: Pathways and substrate-specific regulation of amino acid degradation in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 (archetype of the marine *Roseobacter* clade). In: *Environmental Microbiology* 16 (2014), Nr. 1, S. 218–238. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12276>. – DOI 10.1111/1462-2920.12276. – ISBN 1462–2920
- [DIC⁺04] DELLAGRECA, Marina ; IESCE, Maria R. ; CERMOLA, Flavio ; RUBINO, Maria ; ISIDORI, Marina: Phototransformation of carboxin in water. Toxicity of the pesticide and its sulfoxide to aquatic organisms. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004), Nr. 20, 6228–6232. <http://dx.doi.org/10.1021/jf049737o>. – DOI 10.1021/jf049737o. – ISBN 0021–8561 (Print)\r0021–8561 (Linking)
- [DJL⁺15] DONG, Xiaoyan ; JIANG, Wei ; LI, Chunsheng ; MA, Ning ; XU, Ying ; MENG, Xianghong: Patulin biodegradati-

- on by marine yeast *Kodameae ohmeri*. In: *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 32 (2015), feb, Nr. 3, 352–360. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2015.1007090>. – DOI 10.1080/19440049.2015.1007090. – ISBN 1944–0057 (Electronic)\r1944–0057 (Linking)
- [DLW⁺12] DONG, Xian ; LING, Ning ; WANG, Min ; SHEN, Qirong ; GUO, Shiwei: Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. In: *Plant Physiology and Biochemistry* 60 (2012), nov, 171–179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.08.004>. – DOI 10.1016/j.plaphy.2012.08.004. – ISBN 0981–9428
- [DNG⁺02] DELLA CASA, V ; NOLL, Harald ; GONSER, Susanne ; GROB, Philipp ; GRAF, Federico ; POHLIG, Gabriele: Antimicrobial activity of dequalinium chloride against leading germs of vaginal infections. In: *Arzneimittelforschung* 52 (2002), dec, Nr. 9, 699–705. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1299954>. – DOI 10.1055/s-0031–1299954. – ISBN 0004–4172 (Print)\r0004–4172 (Linking)
- [DVT⁺13] DOGS, Marco ; VOGET, Sonja ; TESHIMA, Hazuki ; PETERSEN, Jörn ; DAVENPORT, Karen ; DALINGAULT, Hajnalka ; CHEN, Amy ; PATI, Amrita ; IVANOVA, Natalia ; GOODWIN, Lynne A. ; CHAIN, Patrick ; DETTER, John C. ; STANDFEST, Sonja ; ROHDE, Manfred ; GRONOW, Sabine ; KYRPIDES, Nokos C. ; WOYKE, Tanja ; MEINHARD, Simon ; KLENK, Hans-Peter ; GÖKER, Markus ; BRINKHOFF, Thorsten: Genome sequence of *Phaeobacter inhibens* type strain (T5T), a secondary metabolite producing representative of the marine *Roseobacter* clade, and emendation of the species description of *Phaeobacter inhibens*. In: *Standards in Genomic Sciences* 9 (2013), dec, Nr. 2, 334–350. <http://dx.doi.org/10.4056/sigs.4448212>. – DOI 10.4056/sigs.4448212. – ISSN 1944–3277
- [DZB10] DICKSCHAT, Jeroen S. ; ZELL, Claudia ; BROCK, Nelson L.: Pathways and Substrate Specificity of DMSP Catabolism in Marine

- Bacteria of the Roseobacter Clade. In: *Chembiochem* 11 (2010), S. 417–425. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200900668>. – DOI 10.1002/cbic.200900668
- [Edw80] EDWARDS, David I.: Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. In: *The British journal of venereal diseases* 56 (1980), oct, Nr. 5, 285–290. <http://dx.doi.org/10.1136/sti.56.5.285>. – DOI 10.1136/sti.56.5.285. – ISBN 0007–134X
- [Edw93] EDWARDS, David I.: Nitroimidazole drugs—action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 31 (1993), Nr. 1, S. 9–20. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/31.1.9>. – DOI 10.1093/jac/31.1.9. – ISBN 0305–7453 (Print)\r0305–7453 (Linking)
- [EHEI⁺93] EL-ABIDIN SALAM, A. Z. ; HUSSEIN, Ebtissam H A. ; EL-ITRIBY, Hanaiya A. ; ANWAR, Wagida A. ; MANSOUR, S A.: The mutagenicity of Gramoxone (paraquat) on different eukaryotic systems. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology* 319 (1993), oct, Nr. 2, 89–101. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218\(93\)90067-N](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218(93)90067-N). – DOI 10.1016/0165–1218(93)90067–N. – ISBN 0165–1218
- [ESSMR07] EL-SHABOURY, Salwa R. ; SALEH, Gamal A. ; MOHAMED, Fardous A. ; RAGEH, Azza H.: *Analysis of cephalosporin antibiotics*
- [FGPP15] FRANK, Oliver ; GÖKER, Markus ; PRADELLA, Silke ; PETERSEN, Jörn: Ocean’s Twelve: flagellar and biofilm chromids in the multipartite genome of *Marinovum algicola* DG898 exemplify functional compartmentalization. In: *Environmental microbiology* 17 (2015), oct, Nr. 10, 4019–4034. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12947>. – DOI 10.1111/1462–2920.12947. – ISBN 1462–2920 (Electronic)\r1462–2912 (Linking)
- [FJG13] FLEWELLING, Andrew J. ; JOHNSON, John A. ; GRAY, Christopher A.: Antimicrobials from the Marine Algal Endophyte *Penicillium* sp. In: *Natural Product Communications* 8 (2013),

- mar, Nr. 3, 373–374. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23678814>. – ISBN 1934–578X
- [FL15] FONDI, Marco ; LIÒ, Pietro: Multi -omics and metabolic modelling pipelines: challenges and tools for systems microbiology. In: *Microbiological Research* 171 (2015), S. 52–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.003>. – DOI 10.1016/j.micres.2015.01.003. – ISBN 1618–0623 (Electronic)\r0944–5013 (Linking)
- [FLC14] FERNANDEZ-LOPEZ, Raul ; CRUZ, Fernando de l.: Rebooting the genome: The role of negative feedback in horizontal gene transfer. In: *Mobile genetic elements* 4 (2014), Nr. 6, 1–6. <http://dx.doi.org/10.4161/2159256X.2014.988069>. – DOI 10.4161/2159256X.2014.988069. – ISSN 2159–2543
- [FMP⁺15] FRANK, Oliver ; MICHAEL, Victoria ; PÄUKER, Orsola ; BOEDEKER, Christian ; JOGLER, Christian ; ROHDE, Manfred ; PETERSEN, Jörn: Plasmid curing and the loss of grip - The 65-kb replicon of *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 is required for biofilm formation, motility and the colonization of marine algae. In: *Systematic and Applied Microbiology* 38 (2015), Nr. 2, S. 120–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.001>. – DOI 10.1016/j.syapm.2014.12.001. – ISBN 1618–0984 (Electronic)\r0723–2020 (Linking)
- [FPR⁺14] FRANK, Oliver ; PRADELLA, Silke ; ROHDE, Manfred ; SCHEUNER, Carmen ; KLENK, Hans-Peter ; GÖKER, Markus ; PETERSEN, Jörn: Complete genome sequence of the *Phaeobacter gallaeciensis* type strain CIP 105210(T) (= DSM 26640(T) = BS107(T)). In: *Standards in genomic sciences* 9 (2014), jun, Nr. 3, 914–32. <http://dx.doi.org/10.4056/sigs.5179110>. – DOI 10.4056/sigs.5179110. – ISSN 1944–3277
- [FPT⁺09] FÜRCH, Tobias ; PREUSSE, Matthias ; TOMASCH, Jürgen ; ZECH, Hajo ; WAGNER-DÖBLER, Irene ; RABUS, Ralf ; WITTMANN, Christoph: Metabolic fluxes in the central carbon metabolism of *Dinoroseobacter shibae* and *Phaeobacter gallaeciensis*, two members of the marine *Roseobacter* clade. In: *BMC*

- microbiology* 9 (2009), jan, 209. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-209>. – DOI 10.1186/1471-2180-9-209. – ISSN 1471-2180
- [Fre99] FREUDIG, Doris: *Lexikon der Biologie*. Heidelberg : Spektrum Verlag, 1999 <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie>. – ISBN 3827417368
- [Fry81] FRY, D E.: The cephalosporin jungle. In: *The American surgeon* 47 (1981), jan, Nr. 1, 40–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7008664>. – ISSN 0003-1348
- [FUDB86] FRISCHKNECHT, Peter M. ; ULMER-DUFEK, Jindra ; BAUMANN, Thomas W.: Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: Expression of an optimal defence strategy? In: *Phytochemistry* 25 (1986), jan, Nr. 3, 613–616. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(86\)88009-8](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(86)88009-8). – DOI 10.1016/0031-9422(86)88009-8. – ISBN 0031-9422
- [FW10] FLEMMING, Hans-Curt ; WINGENDER, Jost: The biofilm matrix. In: *Nature reviews. Microbiology* 8 (2010), sep, Nr. 9, 623–33. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>. – DOI 10.1038/nrmicro2415. – ISSN 1740-1534
- [GBMF99] GIOVANNONI, Stephen J. ; BRITSCHGI, Theresa B. ; MOYER, Craig L. ; FIELD, Katharine G.: Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. In: *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999), may, Nr. 7, 3192–3204. <http://dx.doi.org/10.1038/345060a0>. – DOI 10.1038/345060a0. – ISSN 0028-0836
- [GBN⁺08] GENG, Haifeng ; BRUHN, Jesper B. ; NIELSEN, Kristian F. ; GRAM, Lone ; BELAS, Robert: Genetic dissection of tropodithietic acid biosynthesis by marine roseobacters. In: *Applied and environmental microbiology* 74 (2008), mar, Nr. 5, 1535–45. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02339-07>. – DOI 10.1128/AEM.02339-07. – ISSN 1098-5336

- [GDEZW11] GRUNDLINGH, Johann ; DARGAN, Paul I. ; EL-ZANFALY, Marwa ; WOOD, David M.: *2,4-Dinitrophenol (DNP): A Weight Loss Agent with Significant Acute Toxicity and Risk of Death*. <http://dx.doi.org/10.1007/s13181-011-0162-6>. Version:sep 2011
- [GFF12] GUIMARAES, José R. ; FARAH, Carolina R. T. ; FADINI, Pedro S.: Short-term toxicity test: Monitoring *Klebsiella oxytoca* bacterium respiration using a flow injection analysis/conductometric system. In: *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23 (2012), mar, Nr. 3, 461–467. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012000300012>. – DOI 10.1590/S0103-50532012000300012. – ISSN 01035053
- [Gia99] GIAMARELLOU, H: Fourth generation cephalosporins in the antimicrobial chemotherapy of surgical infections. In: *J Chemother* 11 (1999), dec, Nr. 6, 486–493. <http://dx.doi.org/10.1179/joc.1999.11.6.486>. – DOI 10.1179/joc.1999.11.6.486. – ISSN 1120-009X (Print)
- [GOB⁺10] GEHLENBORG, Nils ; O'DONOGHUE, Seán I. ; BALIGA, Nitin S. ; GOESMANN, Alexander ; HIBBS, Matthew A. ; KITANO, Hiroaki ; KOHLBACHER, Oliver ; NEUWEGER, Heiko ; SCHNEIDER, Reinhard ; TENENBAUM, Dan ; GAVIN, Anne-Claude: Visualization of omics data for systems biology. In: *Nat Methods* 7 (2010), mar, Nr. 3 Suppl, S56—68. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1436>. – DOI 10.1038/nmeth.1436. – ISBN 1548-7105 (Electronic)\n1548-7091 (Linking)
- [GPW99] GARRETT, Edward S. ; PERLEGAS, Demetra ; WOZNIAK, Daniel J.: Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor algT (algU). In: *Journal of Bacteriology* 181 (1999), dec, Nr. 23, 7401–7404. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572149><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC103708>. – ISBN 0021-9193 (Print)
- [GTC⁺13] GABOYER, Frédéric ; TINDALL, Brian J. ; CIOBANU, Maria C. ; DUTHOIT, Frédérique ; LE ROMANCER, Marc ; ALAIN, Karine: *Phaeobacter leonis* sp. nov., an alphaproteobacterium from

- Mediterranean Sea sediments. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63 (2013), Nr. PART9, S. 3301–3306. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.046128-0>. – DOI 10.1099/ijs.0.046128-0. – ISSN 14665026
- [GTH14] GAW, Sally ; THOMAS, Kevin V. ; HUTCHINSON, Thomas H.: Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369 (2014), nov, Nr. 1656, 20130572–. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0572>. – DOI 10.1098/rstb.2013.0572. – ISBN 0962–8436
- [HBG15] HOFNER, Benjamin ; BOCCUTO, Luigi ; GÖKER, Markus: Controlling false discoveries in high-dimensional situations: boosting with stability selection. In: *BMC Bioinformatics* 16 (2015), dec, Nr. 1, 144. <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-015-0575-3>. – DOI 10.1186/s12859-015-0575-3. – ISSN 1471–2105
- [HC06] HERRAIZ, Tomas ; CHAPARRO, Carolina: Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and b-carbolines norharman and harman isolated from coffee. In: *Life Sciences* 78 (2006), jan, Nr. 8, 795–802. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.074>. – DOI 10.1016/j.lfs.2005.05.074. – ISSN 00243205
- [HCS97] HWANG, Deng-Fwu ; CHANG, Sheng-Hsiung ; SHIUA, Chyuan-Yuan: High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. In: *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 693 (1997), Nr. 1, 23–30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00067-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00067-4). – DOI 10.1016/S0378-4347(97)00067-4. – ISBN 0378–4347
- [Hei09] HEIDE, Lutz: The aminocoumarins: biosynthesis and biology. In: *Natural product reports* 26 (2009), oct, Nr. 10, 1241–1250. <http://dx.doi.org/10.1039/b808333a>. – DOI 10.1039/b808333a. – ISBN 0265–0568\ n1460–4752

- [Hen43] HENRY, Richard J.: THE MODE OF ACTION OF SULFONAMIDES THE MODE OF ACTION OF SULFONAMIDES *. 7 (1943), Nr. 4
- [HKA65] HILTON, J L. ; KEARNEY, P C. ; AMES, Bruce N.: Mode of Action of the Herbicide, 3-Amino-1, 2, 4-Triazoles (Amitrole): Inhibition of an Enzyme of Histidine Biosynthesis. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 112 (1965), dec, Nr. 3, 544–547. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(65\)90093-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(65)90093-7). – DOI 10.1016/0003-9861(65)90093-7. – ISBN 0003-9861
- [HLKY10] HARRISON, Peter W. ; LOWER, Ryan P J. ; KIM, Nayoung K D. ; YOUNG, J Peter W.: Introducing the bacterial 'chromid': Not a chromosome, not a plasmid. In: *Trends in Microbiology* 18 (2010), Nr. 4, S. 141–148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.010>. – DOI 10.1016/j.tim.2009.12.010. – ISBN 1878-4380 (Electronic)\n0966-842X (Linking)
- [HWA⁺86] HEDTKE, Steven F. ; WEST, Corlis W. ; ALLEN, Kathleen N. ; NORBERG-KING, Teresa J. ; MOUNT, D: Toxicity of pentachlorophenol to aquatic organisms under naturally varying and controlled environmental conditions. In: *Environmental Toxicology and Chemistry* 5 (1986), jun, Nr. 6, 531–542. [http://dx.doi.org/10.1897/1552-8618\(1986\)5\[531:TOPTAO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1897/1552-8618(1986)5[531:TOPTAO]2.0.CO;2). – DOI 10.1897/1552-8618(1986)5[531:TOPTAO]2.0.CO;2. – ISBN 1552-8618
- [JOS⁺13] JESUS, Fátima T. ; OLIVEIRA, Rhaul ; SILVA, Andreia ; CATARINO, Ana L. ; SOARES, Amadeu M. V. M. ; NOGUEIRA, António J. A. ; DOMINGUES, Inês: Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms. In: *Ecotoxicology* 22 (2013), nov, Nr. 9, 1348–1358. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-013-1121-6>. – DOI 10.1007/s10646-013-1121-6. – ISBN 1064601311216
- [JVP⁺15] JORDAO, Alessandro K. ; VARGAS, Maria D. ; PINTO, Angelo C. ; SILVA, Fernando de C. ; FERREIRA, Vitor F.: Lawsone in organic synthesis. In: *RSC Adv.* 5 (2015), Nr. 83, 67909–

67943. <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA12785H>. – DOI 10.1039/C5RA12785H. – ISSN 2046–2069
- [KD11] KARDOS, Nelson ; DEMAIN, Arnold L.: Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 92 (2011), oct, Nr. 4, 677–687. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3587-6>. – DOI 10.1007/s00253-011-3587-6. – ISSN 0175–7598
- [KGBP10] KNEE, Karen L. ; GOSSETT, Richard ; BOEHM, Alexandria B. ; PAYTAN, Adina: Caffeine and agricultural pesticide concentrations in surface water and groundwater on the north shore of Kauai (Hawaii, USA). In: *Marine Pollution Bulletin* 60 (2010), aug, Nr. 8, 1376–1382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.04.019>. – DOI 10.1016/j.marpolbul.2010.04.019. – ISBN 1879–3363 (Electronic)\r0025–326X (Linking)
- [KGYH13] KLOSTERHAUS, Susan L. ; GRACE, Richard ; HAMILTON, M. C. ; YEE, Donald: Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. In: *Environment International* 54 (2013), apr, 92–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.01.009>. – DOI 10.1016/j.envint.2013.01.009. – ISBN 0160–4120
- [KGS⁺14] KANEHISA, Minoru ; GOTO, Susumu ; SATO, Yoko ; KAWASHIMA, Masayuki ; FURUMICHI, Miho ; TANABE, Mao: Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. In: *Nucleic Acids Research* 42 (2014), jan, Nr. D1, D199–205. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1076>. – DOI 10.1093/nar/gkt1076. – ISBN 1362–4962 (Electronic)
- [KSB11] KAPPAGODA, Shanthi ; SINGH, Upinder ; BLACKBURN, Brian G.: Antiparasitic Therapy. In: *Mayo Clinic Proceedings* 86 (2011), jun, Nr. 6, 561–583. <http://dx.doi.org/10.4065/mcp.2011.0203>. – DOI 10.4065/mcp.2011.0203. – ISSN 00256196
- [KZSK95] KOURAS, A. ; ZOUBOULIS, A. ; SAMARA, C. ; KOUIMTZIS, T.: Removal of pesticides from surface waters by combined phy-

- sicochemical processes. Part I: Dodine. In: *Chemosphere* 30 (1995), jun, Nr. 12, 2307–2315. [http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00103-F](http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(95)00103-F). – DOI 10.1016/0045-6535(95)00103-F. – ISBN 0045-6535
- [LDZ⁺88] LEBEDEV, B. A. ; DOLMATOV, V. Y. ; ZUBAREV, P. S. ; LATYNOV, N. V. ; ALEKSANDROV, M. M. ; PONAMAREVA, R. I.: Preparation of 3,5-dinitrobenzoic acid from meta-nitrobenzoic acid. In: *Pharmaceutical Chemistry Journal* 22 (1988), may, Nr. 5, 399–401. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00769656>. – DOI 10.1007/BF00769656. – ISSN 0091150X
- [LJ10] LIU, Wen-Tso ; JANSSON, Janet K. ; LIU, Wen-Tso (Hrsg.) ; JANSSON, Janet K. (Hrsg.): *Environmental Molecular Microbiology*. <http://www.horizonpress.com/environmental-microbiology><https://books.google.com/books?id=SKghmmWaQaoC{&}pgis=1>. Version: 2010
- [LJH⁺02] LI, Luoping ; JIA, Yonghui ; HOU, Qingming ; CHARLES, Trevor C. ; NESTER, Eugene W. ; PAN, Shen Q.: A global pH sensor: Agrobacterium sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002), sep, Nr. 19, 12369–74. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.192439499>. – DOI 10.1073/pnas.192439499. – ISBN 0027-8424 (Print)
- [Mah69] MAHONEY, L. R.: Antioxidantien. In: *Angewandte Chemie* 81 (1969), aug, Nr. 15, 555–563. <http://dx.doi.org/10.1002/ange.19690811503>. – DOI 10.1002/ange.19690811503. – ISSN 00448249
- [Mer15] MERKL, Rainer: *Bioinformatik - Grundlagen, Algorithmen, Anwendungen*. 3. vollst. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG, 2015. – 634 S. <https://play.google.com/store/books/details?id=M6T-CAAAQBAJ{&}rdid=book-M6T-CAAAQBAJ{&}rdot=1{&}source=gbs{&}vpt{&}read{&}pcampaignid=books{&}booksearch{&}viewport>. – ISBN 9783527685882

- [MFB⁺16] MICHAEL, Victoria ; FRANK, Oliver ; BARTLING, Pascal ; SCHEUNER, Carmen ; GÖKER, Markus ; BRINKMANN, Henner ; PETERSEN, Jörn: Biofilm plasmids with a rhamnose operon are widely distributed determinants of the swim-or-stick lifestyle in roseobacters. In: *The ISME Journal* 10 (2016), oct, Nr. 10, 1–16. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2016.30>. – DOI 10.1038/ismej.2016.30. – ISSN 1751–7362
- [MGG⁺07] MARTENS, Torben ; GRAM, Lone ; GROSSART, Hans-Peter ; KESSLER, Daniel ; MÜLLER, Rolf ; SIMON, Meinhard ; WENZEL, Silke C. ; BRINKHOFF, Thorsten: Bacteria of the Roseobacter clade show potential for secondary metabolite production. In: *Microbial ecology* 54 (2007), jul, Nr. 1, 31–42. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-006-9165-2>. – DOI 10.1007/s00248-006-9165-2. – ISSN 0095–3628
- [MHP⁺06] MARTENS, Torben ; HEIDORN, Thorsten ; PUKALL, Rüdiger ; SIMON, Meinhard ; TINDALL, Brian J. ; BRINKHOFF, Thorsten: Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al. 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1999 as *Marinovu*. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56 (2006), jun, Nr. Pt 6, 1293–304. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63724-0>. – DOI 10.1099/ijs.0.63724-0. – ISSN 1466–5026
- [MLF⁺08] MONSERRAT, José Maria ; LIMA, Juliane V. ; FERREIRA, Josencler Luis R. ; ACOSTA, Daiane ; GARCIA, Márcia L. ; RAMOS, Patricia B. ; MORAES, Tarsila B. ; SANTOS, Luciane C. ; AMADO, Lílían Lund: Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). In: *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 148 (2008), sep, Nr. 3, 287–292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.06.011>. – DOI 10.1016/j.cbpc.2008.06.011. – ISBN 1532–0456

- [MLWL99] MURAJA-LJUBICIC, Jasmina ; WRISCHER, Mercedes ; LJUBEŠIĆ, Nikola: Influence of the Herbicides Amitrole and Norflurazon on Greening of Illuminated Potato Microtubers. In: *Zeitschrift für Naturforschung C* 54 (1999), jan, Nr. 5-6. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-1999-5-607>. – DOI 10.1515/znc-1999-5-607. – ISSN 1865-7125
- [MPZW05] MOAKE, Matthew M. ; PADILLA-ZAKOUR, Olga I. ; WOROBOW, Randy W.: *Comprehensive review of patulin control methods in foods*. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2005.tb00068.x>. Version:jan 2005
- [MRB⁺11] MCDUGALD, Diane ; RICE, Scott A. ; BARRAUD, Nicolas ; STEINBERG, Peter D. ; KJELLEBERG, Staffan: Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. In: *Nature reviews. Microbiology* 10 (2011), nov, Nr. 1, 39-50. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2695>. – DOI 10.1038/nrmicro2695. – ISBN 1740-1534 (Electronic)\r1740-1526 (Linking)
- [MW75] MOSS, Betty ; WOODHEAD, Peter: The effect of two commercial herbicides on the settlement, germination and growth of Enteromorpha. In: *Marine Pollution Bulletin* 6 (1975), dec, Nr. 12, 189-192. [http://dx.doi.org/10.1016/0025-326X\(75\)90056-9](http://dx.doi.org/10.1016/0025-326X(75)90056-9). – DOI 10.1016/0025-326X(75)90056-9. – ISSN 0025326X
- [MWM⁺02] McDONALD, I R. ; WARNER, K L. ; MCANULLA, C ; WOODALL, C A. ; OREMLAND, R S. ; MURRELL, J C.: *A review of bacterial methyl halide degradation: Biochemistry, genetics and molecular ecology*. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00290.x>. Version:apr 2002
- [NL11] NELSON, Mark L. ; LEVY, Stuart B.: The history of the tetracyclines. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1241 (2011), dec, Nr. 1, 17-32. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x>. – DOI 10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x. – ISSN 1749-6632

- [OK98] O'TOOLE, George a. ; KOLTER, Roberto: Initiation of bio-film formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. In: *Molecular Microbiology* 28 (1998), apr, Nr. 3, 449–461. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>. – DOI 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x. – ISSN 0950-382X
- [OS83] OLDENBURG, B ; SPECK, W T.: Metronidazole. In: *Pediatric clinics of North America* 30 (1983), feb, Nr. 1, 71–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6338471>. – ISSN 0031-3955
- [PBB⁺11] PETERSEN, Jörn ; BRINKMANN, Henner ; BERGER, Martine ; BRINKHOFF, Thorsten ; PÄUKER, Orsola ; PRADELLA, Silke: Origin and evolution of a novel DnaA-like plasmid replication type in Rhodobacterales. In: *Molecular biology and evolution* 28 (2011), mar, Nr. 3, 1229–40. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msq310>. – DOI 10.1093/molbev/msq310. – ISSN 1537-1719
- [PBD⁺09] PIEKARSKI, Tanja ; BUCHHOLZ, Ina ; DREPPER, Thomas ; SCHOBERT, Max ; WAGNER-DOEBLER, Irene ; TIELEN, Petra ; JAHN, Dieter: Genetic tools for the investigation of Roseobacter clade bacteria. In: *BMC microbiology* 9 (2009), Nr. 1, 265. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-265>. – DOI 10.1186/1471-2180-9-265. – ISBN 1471-2180
- [PDY⁺12] PADHYE, Subhash ; DANDAWATE, Prasad ; YUSUFI, Mujahid ; AHMAD, Aamir ; SARKAR, Fazlul H.: Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. In: *Medicinal Research Reviews* 32 (2012), nov, Nr. 6, 1131–1158. <http://dx.doi.org/10.1002/med.20235>. – DOI 10.1002/med.20235. – ISBN 1098-1128 (Electronic)\r0198-6325 (Linking)
- [PFGP13] PETERSEN, Jörn ; FRANK, Oliver ; GÖKER, Markus ; PRADELLA, Silke: *Extrachromosomal, extraordinary and essential - The plasmids of the Roseobacter clade*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-4746-8>. Version: apr 2013

- [PFK05] PAIVA, Selma R. ; FIGUEIREDO, Maria R. ; KAPLAN, Maria Auxiliadora C.: Isolation of secondary metabolites from roots of *Plumbago auriculata* Lam. by countercurrent chromatography. In: *Phytochemical Analysis* 16 (2005), Nr. 4, 278–281. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.841>. – DOI 10.1002/pca.841. – ISSN 09580344
- [PGN⁺09] PIRRI, Giovanna ; GIULIANI, Andrea ; NICOLETTO, Silvia F. ; PIZZUTO, Lorena ; RINALDI, Andrea C.: Lipopeptides as anti-infectives: a practical perspective. In: *Central European Journal of Biology* 4 (2009), jul, Nr. 3, 258–273. <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-009-0031-3>. – DOI 10.2478/s11535-009-0031-3. – ISSN 1895–104X
- [PHLL13] PINCKNEY, James L. ; HAGENBUCH, Isaac M. ; LONG, Richard A. ; LOVELL, Charles R.: Sublethal effects of the antibiotic tylosin on estuarine benthic microalgal communities. In: *Marine Pollution Bulletin* 68 (2013), mar, Nr. 1-2, 8–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.006>. – DOI 10.1016/j.marpolbul.2013.01.006. – ISBN 0025–326X
- [PMP⁺15] PAVLOPOULOS, Georgios A. ; MALLIARAKIS, Dimitris ; PAPANIKOLAOU, Nikolas ; THEODOSIOU, Theodosios ; ENRIGHT, Anton J. ; ILIOPOULOS, Ioannis: Visualizing genome and systems biology: technologies, tools, implementation techniques and trends, past, present and future. In: *GigaScience* 4 (2015), Nr. 1, 38. <http://dx.doi.org/10.1186/s13742-015-0077-2>. – DOI 10.1186/s13742-015-0077-2. – ISBN 2047217X (Linking)
- [Psc02] PSCHYREMBEL, Willibald ; PSCHYREMBEL, Willibald (Hrsg.): *Pschyrembel - klinisches Wörterbuch*. 259. Berlin, New York : Walter de Gruyter, 2002. – 1833 S. <http://www.degruyter.com/view/db/pschylkw>. – ISBN 3110165228
- [PWAH07] POMEROY, Lawrence ; WILLIAMS, Peter leB. ; AZAM, Farooq ; HOBBI, John: The Microbial Loop. In: *Oceanography* 20 (2007), Nr. 2, 28–33. <http://dx.doi.org/10.5670/oceanog.2007.45>. – DOI 10.5670/oceanog.2007.45. – ISBN 1042–8275

- [PWETB11] PAPP-WALLACE, Krisztina M. ; ENDIMIANI, Andrea ; TARACILLA, Magdalena a. ; BONOMO, Robert a.: Carbapenems: past, present, and future. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (2011), nov, Nr. 11, 4943–60. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00296-11>. – DOI 10.1128/AAC.00296-11. – ISSN 1098–6596
- [PWN⁺11] PORSBY, Cisse H. ; WEBBER, Mark A. ; NIELSEN, Kristian F. ; PIDDOCK, Laura J. V. ; GRAM, Lone: Resistance and tolerance to tropodithietic acid, an antimicrobial in aquaculture, is hard to select. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (2011), apr, Nr. 4, 1332–1337. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01222-10>. – DOI 10.1128/AAC.01222-10. – ISBN 1098–6596 (Electronic)\r0066–4804 (Linking)
- [PY06] PACE, John L. ; YANG, Guang: *Glycopeptides: Update on an old successful antibiotic class*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.005>. Version: mar 2006
- [RAU71] RÖHLICH, Pal ; ANDERSON, Per ; UVNÄS, Börje: Electron Microscope Observations on Compound 48/80 - Induced Degranulation in Rat Mast Cells. In: *The Journal of Cell Biology* 51 (1971), Nr. 2, 465–483. <http://jcb.rupress.org/content/51/2/465>
- [Raz12] RAZ, R: *Fosfomycin: An old-new antibiotic*. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03636.x>. Version: jan 2012
- [RG03] RAPPE, Michael S. ; GIOVANNONI, Stephen J.: The uncultured microbial majority. In: *Annual Review of Microbiology* 57 (2003), oct, Nr. 1, 369–394. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759>. – DOI 10.1146/annurev.micro.57.030502.090759. – ISBN 0066–4227 (Print)\n0066–4227 (Linking)
- [RGD⁺16] RASMUSSEN, Bastian B. ; GROTKJÆR, Torben ; D’ALVISE, Paul W. ; YIN, Guangliang ; ZHANG, Faxing ; BUNK, Boyke ; SPRÖER, Cathrin ; BENTZON-TILIA, Mikkel ; GRAM, Lone: *Vibrio anguillarum* is genetically and phenotypically unaffected by long-term continuous exposure to the antibacterial compound

- tropodithietic acid. In: *Applied and Environmental Microbiology* 82 (2016), aug, Nr. 15, 4802–4810. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01047-16>. – DOI 10.1128/AEM.01047-16. – ISSN 10985336
- [RGS12] RODRIGUEZ DEL REY, Zoe ; GRANER, Elise F. ; SYLVESTER, Steve: Occurrence and concentration of caffeine in Oregon coastal waters. In: *Marine Pollution Bulletin* 64 (2012), Nr. 7, S. 1417–1424. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.04.015>. – DOI 10.1016/j.marpolbul.2012.04.015. – ISBN 0025-326X
- [RPCLN98] RUIZ-PONTE, C. ; CILIA, V ; LAMBERTL, C ; NICOLASL, J L.: *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 2216 (1998), Nr. 1 998, S. 537–542
- [RQK00] REDDY, Christopher M. ; QUINN, James G. ; KING, John W.: Free and Bound Benzotriazoles in Marine and Freshwater Sediments. In: *Environmental Science & Technology* 34 (2000), Nr. 6, 973–979. <http://dx.doi.org/10.1021/es990971i>. – DOI 10.1021/es990971i. – ISSN 0013-936X
- [RSS07] REZANKA, T ; SPIZEK, J ; SIGLER, Karel: Medicinal use of lincosamides and microbial resistance to them. In: *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 6 (2007), apr, Nr. 2, 133–144. <http://dx.doi.org/10.2174/187152107780361670>. – DOI 10.2174/187152107780361670. – ISBN 18715214
- [RVV⁺05] RUTGEERTS, Paul ; VAN ASSCHE, Gert ; VERMEIRE, Séverine ; D'HAENS, Geert ; BAERT, Filip ; NOMAN, Maja ; AERDEN, Isolde ; DE HERTOOGH, Gert ; GEBOES, Karel ; HIELE, Martin ; D'HOORE, Andre ; PENNINCKX, Freddy: Ornidazole for prophylaxis of postoperative Crohn's disease recurrence: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. In: *Gastroenterology* 128 (2005), apr, Nr. 4, 856–861. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.01.010>. – DOI 10.1053/j.gastro.2005.01.010. – ISBN 0016508505

- [SB09] SLIGHTOM, Rachael N. ; BUCHAN, Alison: MINIREVIEW Surface Colonization by Marine Roseobacters : Integrating Genotype. 75 (2009), Nr. 19, S. 6027–6037. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01508-09>. – DOI 10.1128/AEM.01508-09
- [SBH⁺05] SOERENSEN, Soeren J. ; BAILEY, Mark ; HANSEN, Lars H. ; KROER, Niels ; WUERTZ, Stefan ; SOERENSEN, S J. ; BAILEY, Mark ; HANSEN, Lars H. ; KROER, Niels ; WUERTZ, Stefan: Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. In: *Nature reviews. Microbiology* 3 (2005), sep, Nr. 9, 700–710. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1232>. – DOI 10.1038/nrmicro1232. – ISBN 1740–1526 (Print)\r1740–1526 (Linking)
- [Sch05] SCHOMBURG, Dietmar: Nomenklatur der Lignane und Neolignane. In: *Angewandte Chemie* 186 (2005), apr, Nr. 15, 429–2351. <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200462947>. – DOI 10.1002/ange.200462947. – ISSN 0044–8249
- [SCKC11a] SEYEDSAYAMDOST, Mohammad R. ; CARR, Gavin ; KOLTER, Roberto ; CLARDY, Jon: Roseobacticides: Small Molecule Modulators of an Algal-Bacterial Symbiosis. In: *Journal of the American Chemical Society* 133 (2011), nov, Nr. 45, 18343–18349. <http://dx.doi.org/10.1021/ja207172s>. – DOI 10.1021/ja207172s. – ISSN 0002–7863
- [SCKC11b] SEYEDSAYAMDOST, Mohammad R. ; CASE, Rebecca J. ; KOLTER, Roberto ; CLARDY, Jon: The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. In: *Nature chemistry* 3 (2011), apr, Nr. 4, 331–5. <http://dx.doi.org/10.1038/nchem.1002>. – DOI 10.1038/nchem.1002. – ISSN 1755–4349
- [SCKC11c] SEYEDSAYAMDOST, Mohammad R. ; CASE, Rebecca J. ; KOLTER, Roberto ; CLARDY, Jon: The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. In: *Nature chemistry* 3 (2011), apr, Nr. 4, 331–5. <http://dx.doi.org/10.1038/nchem.1002>. – DOI 10.1038/nchem.1002. – ISSN 1755–4349
- [SCP⁺13] SCHOMBURG, Ida ; CHANG, Antje ; PLACZEK, Sandra ; SÖHNGEN, Carola ; ROTHER, Michael ; LANG, Maren ; MUNARETTO,

- Cornelia ; ULAS, Susanne ; STELZER, Michael ; GROTE, Andreas ; SCHEER, Maurice ; SCHOMBURG, Dietmar: BRENDA in 2013: Integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: New options and contents in BRENDA. In: *Nucleic Acids Research* 41 (2013), jan, Nr. D1, D764–72. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1049>. – DOI 10.1093/nar/gks1049. – ISBN 1362–4962 (Electronic)
- [SDC12] SUNASSEE, Suthananda N. ; DAVIES-COLEMAN, Michael T.: Cytotoxic and antioxidant marine prenylated quinones and hydroquinones. In: *Natural Product Reports* 29 (2012), Nr. 5, 513. <http://dx.doi.org/10.1039/c2np00086e>. – DOI 10.1039/c2np00086e. – ISBN 0265–0568
- [SGE00] SOCLO, H. H. ; GARRIGUES, Ph ; EWALD, M: Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: Case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. In: *Marine Pollution Bulletin* 40 (2000), Nr. 5, 387–396. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00200-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00200-3). – DOI 10.1016/S0025-326X(99)00200-3. – ISBN 0025–326X
- [SHR08] STAMATAKIS, Alexandros ; HOOVER, Paul ; ROUGEMONT, Jacques: A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. In: *Systematic biology* 57 (2008), oct, Nr. 5, 758–771. <http://dx.doi.org/10.1080/10635150802429642>. – DOI 10.1080/10635150802429642. – ISSN 1076–836X
- [SJW12] SCHIRMER, Ulrich ; JESCHKE, Peter ; WITSCHEL, Matthias: *Modern crop protection compounds Vol. 1. Vol. 1.* [Chichester], 2012. – 1498 S. – ISBN 9783527329656 352732965X
- [SM84] SUNDARAM, S ; MURTHY, K V.: Transferable plasmid-mediated drug resistance among non-O1 *Vibrio cholerae* and rough strains of *Vibrio cholerae* from Tamilnadu, India. In: *Journal of Hygiene* 92 (1984), feb, Nr. 1, 59–65. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022172400064032>. – DOI 10.1017/S0022172400064032. – ISSN 00221724

- [SM88] SILVER, Simon ; MISRA, Tapan K.: PLASMID-MEDIATED HEAVY METAL RESISTANCES. In: *Current* 42 (1988), oct, Nr. 1, 717–743. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.003441>. – DOI 10.1146/annurev.mi.42.100188.003441. – ISSN 0066–4227
- [SMNM05] SCHAEFER, Hendrik ; McDONALD, Ian R. ; NIGHTINGALE, Phil D. ; MURRELL, J. C.: Evidence for the presence of a CmuA methyltransferase pathway in novel marine methyl halide-oxidizing bacteria. In: *Environmental Microbiology* 7 (2005), mar, Nr. 6, 839–852. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00757.x>. – DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00757.x. – ISBN 1462–2912
- [SSB04] SELJE, Natascha ; SIMON, Meinhard ; BRINKHOFF, Thorsten: A newly discovered Roseobacter cluster in temperate and polar oceans. In: *Nature* 427 (2004), jan, Nr. 6973, 445–448. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02272>. – ISSN 0028–0836
- [SSDB13] SAHA, Ratul ; SAHA, Nabaneeta ; DONOFRIO, Robert S. ; BESTERVELT, Lorelle L.: Microbial siderophores: A mini review. In: *Journal of Basic Microbiology* 53 (2013), mar, Nr. 4, 303–317. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201100552>. – DOI 10.1002/jobm.201100552. – ISBN 978–3–211–99660–7
- [SSHS01] STICKEL, F ; SEITZ, H K. ; HAHN, E G. ; SCHUPPAN, D: Liver toxicity of drugs of plant origin. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 39 (2001), mar, Nr. 3, 225–32, 234–7. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2001-11772>. – DOI 10.1055/s-2001-11772. – ISBN 0044–2771 (Print)
- [SSJB13] STOKOWA-SOŁTYS, Kamila ; JEZOWSKA-BOJCZUK, Małgorzata: A rice fungicide blasticidin S efficiently binds Cu(II) ions and prevents DNA from metal-induced damage. In: *Journal of Inorganic Biochemistry* 127 (2013), oct, 73–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.06.014>. – DOI 10.1016/j.jinorgbio.2013.06.014. – ISSN 01620134

- [SSS⁺09] SELVIN, Joseph ; SHANMUGHA PRIYA, S. ; SEGHAL KIRAN, G. ; THANGAVELU, T. ; SAPNA BAI, N.: Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. In: *Microbiological Research* 164 (2009), Nr. 3, 352–363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2007.05.005>. – DOI 10.1016/j.micres.2007.05.005. – ISBN 0944–5013
- [Sta09] STANGER, Amnon: What is aromaticity: a critique of the concept of aromaticity, can it really be defined? In: *Chemical Communications* 0 (2009), Nr. 15, 1939 – 1947. <http://dx.doi.org/10.1039/b816811c>. – DOI 10.1039/b816811c. – ISBN 1359–7345
- [Sun02] SUNTRES, Zacharias E.: Role of antioxidants in paraquat toxicity. In: *Toxicology* 180 (2002), oct, Nr. 1, 65–77. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00382-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00382-7). – DOI 10.1016/S0300-483X(02)00382-7. – ISBN 0300–483X
- [Tat71] TATSUOKA, M.M.: *Multivariate Analysis: Techniques for Educational and Psychological Research*. Wiley, 1971. – 310 S. – ISBN 0471845906
- [TKV⁺12] THOLE, Sebastian ; KALHOEFER, Daniela ; VOGET, Sonja ; BERGER, Martine ; ENGELHARDT, Tim ; LIESEGANG, Heiko ; WOLLHERR, Antje ; KJELLEBERG, Staffan ; DANIEL, Rolf ; SIMON, Meinhard ; THOMAS, Torsten ; BRINKHOFF, Thorsten: *Phaeobacter gallaeciensis* genomes from globally opposite locations reveal high similarity of adaptation to surface life. In: *The ISME Journal* 6 (2012), Nr. 12, 1–16. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.62>. – DOI 10.1038/ismej.2012.62. – ISBN 1751–7362
- [TWH⁺16] TRAUTWEIN, Kathleen ; WILL, SE ; HULSCH, R ; MASCHMANN, U ; WIEGMANN, K ; HENSLE, M ; MICHAEL, V ; RUPPERSBERG, H ; WÜNSCH, D ; FEENDERS, C ; KALTENHÄUSER, S ; ULBRICH, M ; SCHMIDT-HOHAGEN, K ; BLASIUS, B ; PETERSEN, J ; SCHOMBURG, D ; RABUS, R: Native plasmids restrict growth of *Phaeobacter inhibens* DSM 17395. Energetic costs of plasmids assessed by quantitative physiological analyses. In: *Environmental*

- Microbiology* (in press) (2016). <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13381>. – DOI 10.1111/1462-2920.13381. – ISSN 14622912
- [Ung96] UNGER, Thomas A.: *Pesticide Synthesis Handbook*. Noyes Publications, 1996. – 261–265 S. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-081551401-5.50204-5>. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-081551401-5.50204-5>. – ISBN 9780815514015
- [VHF08] VASS, M ; HRUSKA, K ; FRANEK, M: *Nitrofurantoin antibiotics: A review on the application, prohibition and residual analysis*. 2008
- [VKB⁺12] VANSTEELENDT, Marieke ; KERZAON, Isabelle ; BLANCHET, Elodie ; FOSSI TANKOUA, Olivia ; ROBIOU DU PONT, Thibaut ; JOUBERT, Yolaine ; MONTEAU, Fabrice ; LE BIZEC, Bruno ; FRISVAD, Jens C. ; POUCHUS, Yves F. ; GROVEL, Olivier: Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains. In: *Fungal Biology* 116 (2012), Nr. 9, S. 954–961. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2012.06.005>. – DOI 10.1016/j.funbio.2012.06.005. – ISBN 1878–6146
- [VPS⁺03] VIVEKANANTHAN, Deepak P. ; PENN, Marc S. ; SAPP, Shelly K. ; HSU, Amy ; TOPOL, Eric J.: Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: Meta-analysis of randomised trials. In: *Lancet* 361 (2003), jun, Nr. 9374, 2017–2023. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13637-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13637-9). – DOI 10.1016/S0140-6736(03)13637-9. – ISBN 1474–547X (Electronic) 0140–6736 (Linking)
- [VSH⁺13] VAAS, Lea A I. ; SIKORSKI, Johannes ; HOFNER, Benjamin ; FIEBIG, Anne ; BUDDRUHS, Nora ; KLENK, Hans P. ; GÖKER, Markus: Opm: An R package for analysing OmniLog(R) phenotype microarray data. In: *Bioinformatics* 29 (2013), jul, Nr. 14, 1823–1824. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt291>. – DOI 10.1093/bioinformatics/btt291. – ISBN 1367–4811 (Electronic) 1367–4803 (Linking)
- [VSM⁺12] VAAS, Lea a I. ; SIKORSKI, Johannes ; MICHAEL, Victoria ; GÖKER, Markus ; KLENK, Hans-Peter: Visualization and curve-

- parameter estimation strategies for efficient exploration of phenotype microarray kinetics. In: *PloS one* 7 (2012), jan, Nr. 4, e34846. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034846>. – DOI 10.1371/journal.pone.0034846. – ISSN 1932–6203
- [Wag03] WAGENITZ, Gerhard ; FISCHER, Gustav (Hrsg.): *Wörterbuch der Botanik : Die Termini in ihrem historischen Zusammenhang*. Zweite, er. Heidelberg, Berlin : Spektrum Akademischer Verlag, 2003. – 552 S. – ISBN 3–8274–1398–2
- [War07] WARDMAN, P.: Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy. In: *Clinical Oncology* 19 (2007), aug, Nr. 6, 397–417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clon.2007.03.010>. – DOI 10.1016/j.clon.2007.03.010. – ISBN 0936–6555 (Print) 0936–6555 (Linking)
- [War17] WARNKE, Ulrich: *Bionische Regeneration Das Altern aufhalten mit den geheimen Strategien der Natur*. 2. Auflage. Arkana Verlag, 2017. – 608 S. https://play.google.com/store/books/details?id=M3KmdQAAQBAJ&rdid=book-M3KmdQAAQBAJ&rdot=1&source=gbs_vpt_read&pcampaignid=books_booksearch_viewport. – ISBN 9783641178734
- [WCW98] WHITMAN, W. B. ; COLEMAN, D. C. ; WIEBE, W. J.: Prokaryotes: The unseen majority. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (1998), jun, Nr. 12, 6578–6583. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>. – DOI 10.1073/pnas.95.12.6578. – ISSN 0027–8424
- [WDB06] WAGNER-DÖBLER, Irene ; BIEBL, Hanno: Environmental biology of the marine Roseobacter lineage. In: *Annual review of microbiology* 60 (2006), jan, 255–80. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142115>. – DOI 10.1146/annurev.micro.60.080805.142115. – ISSN 0066–4227
- [Whe84] WHELTON, A: The aminoglycosides. In: *Clinical orthopaedics and related research* (1984), nov, Nr. 190, 66–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6386262>. – ISSN 0009–921X

- [WHW⁺14] WIEGMANN, Katharina ; HENSLER, Michael ; WÖHLBRAND, Lars ; ULBRICH, Marcus ; SCHOMBURG, Dietmar ; RABUS, Ralf: Carbohydrate catabolism in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, a member of the marine roseobacter clade. In: *Applied and Environmental Microbiology* 80 (2014), aug, Nr. 15, 4725–4737. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00719-14>. – DOI 10.1128/AEM.00719-14. – ISSN 10985336
- [WK00] WATNICK, Paula ; KOLTER, Roberto: *Biofilm, city of microbes*. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679>. 2000. Version: may 2000
- [WL01] WEBSTER, C.D. (Hrsg.) ; LIM, C. (Hrsg.): *Nutrition and Fish Health*. New York, London, Oxford : Food Products Press, An Imprint of The Haworth Press, Inc, 2001. – 393 S. <http://dx.doi.org/asdf>. <http://dx.doi.org/asdf>. – ISBN 0123196523
- [WLG⁺07] WANG, Feng ; LANGLEY, Robert ; GULTEN, Gulcin ; DOVER, Lynn G. ; BESRA, Gurdyal S. ; JACOBS, William R. ; SACCHETTINI, James C.: Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. In: *J Exp Med* 204 (2007), Nr. 1, 73–8. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20062100>. – DOI 10.1084/jem.20062100. – ISBN 0022-1007 (Print)\r0022-1007 (Linking)
- [WNSH⁺17] WILL, Sabine E. ; NEUMANN-SCHAAL, Meina ; HEYDORN, Raymond L. ; BARTLING, Pascal ; PETERSEN, Jörn ; SCHOMBURG, Dietmar: The limits to growth - energetic burden of the endogenous antibiotic tropodithietic acid in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395. In: *PloS one* 12 (2017), Nr. 5, S. 1–11. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0177295>. – DOI 10.1371/journal.pone.0177295
- [WS71] WEHRLI, W ; STAEHELIN, M: Actions of the rifamycins. In: *Bacteriological reviews* 35 (1971), sep, Nr. 3, 290–309. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5001420><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC378391>. – ISSN 0005-3678

- [WS98] WANASUNDARA, U N. ; SHAHIDI, F: Stabilization of marine oils with flavonoids. In: *Journal of Food Lipids* 5 (1998), sep, Nr. 3, 183–196. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.1998.tb00119.x>. – DOI 10.1111/j.1745-4522.1998.tb00119.x. – ISBN 10657258 (ISSN)
- [WWGS16] WILSON, Maxwell Z. ; WANG, Rurun ; GITAI, Zemer ; SEYEDSA-YAMDOST, Mohammad R.: Mode of action and resistance studies unveil new roles for tropodithietic acid as an anticancer agent and the γ -glutamyl cycle as a proton sink. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (2016), feb, Nr. 6, 1630–1635. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1518034113>. – DOI 10.1073/pnas.1518034113. – ISBN 1091-6490 0027-8424
- [XSB⁺11] XUE, Xiaoli ; SZTAJER, Helena ; BUDDRUHS, Nora ; PETERSEN, Jörn ; ROHDE, Manfred ; TALAY, Susanne R. ; WAGNER-DÖBLER, Irene: Lack of the delta subunit of RNA polymerase increases virulence related traits of *Streptococcus mutans*. In: *PloS one* 6 (2011), jan, Nr. 5, e20075. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020075>. – DOI 10.1371/journal.pone.0020075. – ISSN 1932-6203
- [YO08] YORK, William S. ; O'NEILL, Malcolm A.: *Biochemical control of xylan biosynthesis - which end is up?* <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.02.007>. Version:jun 2008
- [ZHK⁺13] ZECH, Hajo ; HENSLER, Michael ; KOSSMEHL, Sebastian ; DRÜPPEL, Katharina ; WÖHLBRAND, Lars ; TRAUTWEIN, Kathleen ; COLBY, Thomas ; SCHMIDT, Jürgen ; REINHARDT, Richard ; SCHMIDT-HOHAGEN, Kerstin ; SCHOMBURG, Dietmar ; RABUS, Ralf: Dynamics of amino acid utilization in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395. In: *Proteomics* 13 (2013), oct, Nr. 18-19, 2869–85. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200560>. – DOI 10.1002/pmic.201200560. – ISSN 1615-9861
- [ZLFH14] ZAN, Jindong ; LIU, Yue ; FUQUA, Clay ; HILL, Russell T.: *Acyl-homoserine lactone quorum sensing in the Roseobacter clade*. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms15010654>. Version: 2014

- [ZTS⁺09] ZECH, Hajo ; THOLE, Sebastian ; SCHREIBER, Kerstin ; KALHÖFER, Daniela ; VOGET, Sonja ; BRINKHOFF, Thorsten ; SIMON, Meinhard ; SCHOMBURG, Dietmar ; RABUS, Ralf: Growth phase-dependent global protein and metabolite profiles of *Phaeobacter gallaeciensis* strain DSM 17395, a member of the marine Roseobacter-clade. In: *Proteomics* 9 (2009), jul, Nr. 14, 3677–97. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200900120>. – DOI 10.1002/pmic.200900120. – ISBN 1494417983404